



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
DITERPENOS TIPO *NEO-CLERODANO* AISLADOS DE *Salvia herbacea*, *S. shannoni* Y *S.
microphylla*”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. FRANCISCO ELIHU BAUTISTA REDONDA



TUTOR: Dr. ALFREDO ORTEGA HERNANDEZ

AÑO: 2012

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Leovigildo Quijano
Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal: Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas
Vocal: Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Secretario: Dr. José Fausto Rivero Cruz

La presente tesis se realizó en el laboratorio 2-7 del
Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México
bajo la dirección del Dr. Alfredo Ortega Hernández.

Sustentante:

Tutor:

M. en C. Francisco Elihú Bautista Redonda

Dr. Alfredo Ortega Hernández

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de becario 204936) por el apoyo económico otorgado para la realización del proyecto.
- Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la redacción de tesis.
- Al Dr. Alfredo Ortega Hernández por la confianza y la asesoría brindada a lo largo de mi formación académica.
- A los miembros de mi Comité Tutelar: Dra. Ma. Isabel Aguilar Laurents y Dra. María Yolanda Ríos Gómez por sus sugerencias y comentarios durante el desarrollo de la tesis.
- A la M. en C. Emma Maldonado por los comentarios durante el aislamiento y la elucidación estructural.
- A la M. en C. María del Rosario García Peña por la determinación botánica de los ejemplares.
- Al Dr. Fernando Calzada Bermejo y la Dra. Lilian Yépez Mulia por las determinaciones de actividad antiprotozoaria.
- Al M. en C. Antonio Nieto Camacho y M. en C. María Teresa Ramírez Apan por las determinaciones de actividad antiinflamatoria y citotóxica.
- A los miembros del Jurado: Dr. Leovigildo Quijano, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas, Dra. María Isabel Aguilar Laurents y Dr. José Fausto Rivero Cruz por las correcciones y comentarios de la tesis.
- Al personal técnico del Instituto de Química: M. en C. Carmen Márquez, M. en C. Eréndira García, Q. Rocío Patiño, Dra. Beatriz Quiroz, Dra. Isabel Chávez, Dr. Rubén Gaviño, Dr. Alfredo Toscano, Dr. Héctor Ríos, IQ. Luis Velasco y Dr. Javier Pérez.



Salvia herbacea Benth.



Salvia shannoni J. D. Smith



Salvia microphylla Kunth

RESUMEN

En la presente disertación se describe el estudio de la composición química de extractos, obtenidos de las hojas y flores de tres especies del género *Salvia*. Las especies estudiadas fueron: *Salvia herbacea* Benth., *Salvia shannoni* J. D. Smith y *Salvia microphylla* Kunth.

Salvia herbacea Benth. es una especie que no tiene usos descritos en la medicina tradicional de México, del extracto de sus hojas y flores, obtenido con acetona se aislaron ocho *neo*-clerodanos con estructura no descrita en la literatura, a los que se les dió el nombre de tehuáninas A-H (**7**, **8**, **11**, **1**, **6**, **5**, **4** y **9**), en consideración al sitio de recolección de la planta: el Istmo de Tehuantepec; tres de estos diterpenos (tehuáninas A-C) contienen en su estructura una funcionalidad 1,8-epoxi, siendo esta la primera vez que se reportan este tipo de compuestos, adicionalmente se aislaron dos diterpenos que fueron identificados como 1(10)-dehidrosalviarina (**2**) y 1 α ,10 α -epoxisalviarina (**3**), la estructura de ésta última fue corregida, quedando como 1 β ,10 β -epoxisalviarina.

Del extracto obtenido de las hojas de *Salvia shannoni* J. D. Smith se aislaron diez *neo*-clerodanos, cuatro de ellos con estructura conocida e identificados como: esplenólida A (**21**), 8-hidroxisalviarina (**14**), infuscatina (**17**) y tehuánina G (**4**). Los seis diterpenos restantes (**15**, **16**, **18-20** y **22**) poseen estructuras que no han sido reportadas y presentan variaciones estructurales debidas a la diferente posición de grupos epóxido, dobles ligaduras y alcoholes terciarios. Este estudio, al igual que para *Salvia herbacea* son los primeros que se hacen sobre la composición química de estas especies.

La especie *Salvia microphylla* Kunth. recibe el nombre común de “mirto” en la medicina tradicional y es empleada para tratar padecimientos gastrointestinales, problemas menstruales, insomnio y para disminuir la ansiedad. La especie consta de tres variedades, dos de ellas se han estudiado químicamente y de ellas se han aislado pimaranos y clerodanos. En este caso, describimos el aislamiento de dos *neo*-clerodanos (**25** y **27**), dos 5,10-*seco-neo*-cleordanos (**23** y **24**) y un nuevo esqueleto carbocíclico con un sistema anular 9/3 (**26**).

En una segunda etapa se evaluó la actividad biológica de algunos de los diterpenos aislados como agentes antiinflamatorios (modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón), antiprotozoarios (contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*) y citotóxicos (contra las líneas celulares de carcinomas humanos: U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7 y SKLU-1). Los resultados de estas pruebas mostraron una fuerte actividad antiinflamatoria del compuesto **4** y baja actividad citotóxica sobre las líneas celulares evaluadas, con excepción del compuesto **5** que mostró citotoxicidad marginal contra las líneas U251 y SKLU-1. La actividad antiprotozoaria de los compuestos evaluados en esta prueba resultó ser baja comparada con el compuesto de referencia (linearolactona).

ABSTRACT

The present dissertation describes the isolation and structural elucidation of the secondary metabolites of three species from *Salvia* genus. The species studied were *Salvia herbacea* Benth., *Salvia shannoni* J. D. Smith y *Salvia microphylla* Kunth. The Me₂CO extract of the aerial parts from *Salvia herbacea* Benth., through successive chromatographic process yielded ten *neo*-cleodane diterpenoids, eight of them with unreported structure, we called these compounds tehuainins A-H (**7**, **8**, **11**, **1**, **6**, **5**, **4** and **9**), in relation to the collection place: Isthmus of Tehuantepec. Additionally, two more diterpenes were isolated, 1(10)dehydrosalviarin (**2**) and 1 α ,10 α -epoxysalviarin (**3**), the structure of the second one was revised to 1 β ,10 β -epoxysalviarin. From the Me₂CO extract of the leaves of *Salvia shannoni* J. D. Smith allowed us to the isolation of ten *neo*-clerodane diterpenes, six of them with structure not described in the literature (**15**, **16**, **18-20** y **22**), as well as four with known structure, they were identified as 8-hydroxysalviarin (**14**), infuscatin (**17**), splenolide A (**21**) and tehuainine G (**4**). Meanwhile, fractionation of the Me₂CO extract of leaves and flowers from *Salvia microphylla* Kunth. yielded two *neo*-clerodanes (**25** and **27**), two 5,10-*seco-neo*-clerodanes (**23** and **24**) and a diterpenoid with a novel carbocyclic skeleton (**26**).

In a second stage the pharmacological properties of some of the diterpenes were assayed looking for biological activity, as antiinflammatory (TPA-edema induced edama model), antiprotozoal (against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*) and citotoxicity (against six cellular lines of human carcinoma: U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7 y SKLU-1). The results of these assays showed a strong antiinflammatory activity of the tehuainine G (**4**). The antiprotozoal and citotoxic activities of the tested compounds were lower as compared to reference compounds.

INDICE

	Página
Lista de abreviaturas	III
Lista de espectros	V
Lista de figuras	VIII
Lista de tablas	XI
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Generalidades sobre el género <i>Salvia</i>	2
2.2 Usos etnobotánicos de especies del género <i>Salvia</i>	2
2.3 Química del género <i>Salvia</i>	4
2.3.1 Compuestos fenólicos	4
2.3.2 Flavonoides	5
2.3.4 Terpenoides	6
2.4 Estudios químicos previos de especies taxonómicamente relacionadas del género <i>Salvia</i>	11
2.4.1 <i>Salvia herbacea</i> Benth.	11
2.4.2 <i>Salvia shannoni</i> J. D. Smith	11
2.4.3 <i>Salvia microphylla</i> Kunth.	11
2.5 Propiedades biológicas de diterpenos con esqueleto de clerodano	14
2.5.1 Afinidad por los receptores opioides	14
2.5.2 Actividad antialimentaria	16
2.5.3 Actividad antibacteriana	18
2.5.4 Actividad antiinflamatoria	19
2.5.5 Actividad antiprotozoaria	20
2.5.6 Actividad citotóxica	21
3. JUSTIFICACION	24
4. OBJETIVOS	24
5. PARTE EXPERIMENTAL	25
5.1 Métodos de separación	25
5.2 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas	25
5.3 Bioensayos de actividad biológica	25
5.3.1 Actividad antiinflamatoria: Modelo de edema inducido por TPA	25
5.3.2 Actividad antiprotozoaria	26
5.3.3 Actividad citotóxica	27
5.4 Aislamiento de los metabolitos secundarios	27

INDICE (continuación)

	Página
6. RESULTADOS Y DISCUSION	39
6.1 Estudio químico de <i>Salvia herbacea</i> Benth.	39
6.2 Estudio químico de <i>Salvia shannoni</i> J. D. Smith	53
6.3 Estudio químico de <i>Salvia microphylla</i> Kunth	64
6.4 Evaluación de la actividad biológica	72
6.4.1 Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón	72
6.4.2 Actividad antiprotozoaria	74
6.4.3 Actividad citotóxica	75
7. CONCLUSIONES	77
8. REFERENCIAS	78
Apéndice A: Espectros de RMN de los compuestos aislados de <i>Salvia herbacea</i>	86
Apéndice B: Espectros de RMN de los compuestos aislados de <i>Salvia shannoni</i>	121
Apéndice C: Espectros de RMN de los compuestos aislados de <i>Salvia microphylla</i>	146
Apéndice D: Artículo derivado del proyecto de investigación	162

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
α	Rotación óptica observada en el polarímetro
δ	Desplazamiento químico
μL	Microlitros
μg	Microgramos
μM	Micromolar
λ_{max}	Longitud de onda de absorción máxima en la región del ultravioleta
AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en columna de vacío
CCF	Cromatografía en capa fina
CH_2Cl_2	Diclorometano
CHCl_3	Cloroformo
cm	Centímetros
COSY	Espectroscopía de Correlación ^1H - ^1H
di	Diámetro interno de la columna cromatográfica
DMSO	Dimetilsulfóxido
HRMS-FAB ⁺	Espectrometría de Masas de alta resolución de Bombardeo de Átomos Rápidos en modalidad positiva
MS-ESI ⁺	Espectrometría de Masas de electrospray en modalidad positiva
MS-EI ⁺	Espectrometría de Masas de Impacto Electrónico en modalidad positiva
EGS	Especies del Género <i>Salvia</i>
g	Gramos
GPS	Sistema de Posicionamiento Global
h	Altura de la columna para cromatografía
hex	Hexano
HMBC	Correlación Heteronuclear a Enlaces Múltiples ^{13}C - ^1H
HSQC	Correlación Espectroscópica Heteronuclear a un enlace ^{13}C - ^1H
Hz	Hertz
IC_{50}	Concentración inhibitoria media
Int. Rel.	Intensidad Relativa
IR	Infrarojo
J	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramos
L	Litros
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
m/z	Relación masa-carga
nm	nanómetros

LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

Abreviatura	Significado
NOE	Efecto Nuclear Overhauser
NOESY	Espectroscopia de Efecto Nuclear Overhauser
NOM	Norma Oficial Mexicana
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
sa	Sin actividad
TPA	13-acetato-12-tetradecanoilforbol
UV	Ultravioleta

LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro A-1: RMN ^1H del compuesto 1	87
Espectro A-2: RMN ^{13}C del compuesto 1	88
Espectro A-3: RMN ^1H del compuesto 2	89
Espectro A-4: RMN ^{13}C del compuesto 2	90
Espectro A-5: RMN ^1H del compuesto 3	91
Espectro A-6: RMN ^{13}C del compuesto 3	92
Espectro A-7: RMN ^1H del compuesto 4	93
Espectro A-8: RMN ^{13}C del compuesto 4	94
Espectro A-9: RMN ^1H del compuesto 5	95
Espectro A-10: RMN ^{13}C del compuesto 5	96
Espectro A-11: Experimento DEPT del compuesto 5	97
Espectro A-12: Experimento COSY del compuesto 5	98
Espectro A-13: Experimento HMBC del compuesto 5	99
Espectro A-14: Experimento NOESY del compuesto 5	100
Espectro A-15: RMN ^1H del compuesto 6	101
Espectro A-16: RMN ^{13}C del compuesto 6	102
Espectro A-17: RMN ^1H del compuesto 7	103
Espectro A-18: RMN ^{13}C del compuesto 7	104
Espectro A-19: Experimento DEPT del compuesto 7	105
Espectro A-20: Experimento COSY del compuesto 7	106
Espectro A-21: Experimento HMBC del compuesto 7	107
Espectro A-22: Experimento NOESY del compuesto 7	108
Espectro A-23: RMN ^1H del compuesto 8	109
Espectro A-24: RMN ^{13}C del compuesto 8	110
Espectro A-25: RMN ^1H del compuesto 9	111
Espectro A-26: RMN ^{13}C del compuesto 9	112
Espectro A-27: RMN ^1H del compuesto 10	113
Espectro A-28: RMN ^{13}C del compuesto 10	114
Espectro A-29: RMN ^1H del compuesto 11	115
Espectro A-30: RMN ^{13}C del compuesto 11	116
Espectro A-31: RMN ^1H del compuesto 12	117
Espectro A-32: RMN ^{13}C del compuesto 12	118

LISTA DE ESPECTROS (continuación)

	Página
Espectro A-33: RMN ^1H del compuesto 13	119
Espectro A-34: RMN ^{13}C del compuesto 13	120
Espectro B-1: RMN ^1H del compuesto 14	122
Espectro B-2: RMN ^{13}C del compuesto 14	123
Espectro B-3: RMN ^1H del compuesto 15	124
Espectro B-4: RMN ^{13}C del compuesto 15	125
Espectro B-5: Experimento COSY del compuesto 15	126
Espectro B-6: Experimento HMBC del compuesto 15	127
Espectro B-7: Experimento NOESY del compuesto 15	128
Espectro B-8: RMN ^1H del compuesto 16	129
Espectro B-9: RMN ^{13}C del compuesto 16	130
Espectro B-10: RMN ^1H del compuesto 17	131
Espectro B-11: RMN ^{13}C del compuesto 17	132
Espectro B-12: RMN ^1H del compuesto 18	133
Espectro B-13: RMN ^{13}C del compuesto 18	134
Espectro B-14: RMN ^1H del compuesto 19	135
Espectro B-15: RMN ^{13}C del compuesto 19	136
Espectro B-16: RMN ^1H del compuesto 20	137
Espectro B-17: RMN ^{13}C del compuesto 20	138
Espectro B-18: RMN ^1H del compuesto 21	139
Espectro B-19: RMN ^{13}C del compuesto 21	140
Espectro B-20: RMN ^1H del compuesto 22	141
Espectro B-21: RMN ^{13}C del compuesto 22	142
Espectro B-22: Experimento COSY del compuesto 22	143
Espectro B-23: Experimento HMBC del compuesto 22	144
Espectro B-24: Experimento NOESY del compuesto 22	145
Espectro C-1: RMN ^1H del compuesto 23	147
Espectro C-2: RMN ^{13}C del compuesto 23	148
Espectro C-3: RMN ^1H del compuesto 24	149
Espectro C-4: RMN ^{13}C del compuesto 24	150
Espectro C-5: RMN ^1H del compuesto 25	151
Espectro C-6: RMN ^{13}C del compuesto 25	152
Espectro C-7: RMN ^1H de la linearolactona	153

LISTA DE ESPECTROS (continuación)

	Página
Espectro C-8: RMN ^{13}C de la linearolactona	154
Espectro C-9: RMN ^1H del compuesto 26	155
Espectro C-10: RMN ^{13}C del compuesto 26	156
Espectro C-11: Experimento COSY del compuesto 26	157
Espectro C-12: Experimento HMBC del compuesto 26	158
Espectro C-13: Experimento NOESY del compuesto 26	159
Espectro C-14: RMN ^1H del compuesto 27	160
Espectro C-15: RMN ^{13}C del compuesto 27	161

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diterpenos mayoritarios aislados de <i>Salvia miltiorrhiza</i>	3
2. Acidos salvianólicos aislados de EGS	4
3. Oligómeros del ácido cafeico y glucósidos fenólicos aislados de EGS	5
4. Flavonoides aislados de EGS	6
5. Sesquiterpenos aislados de EGS	7
6. Abietanos aislados de <i>Salvias</i> con distribución en Asia y Europa	8
7. Abietanos e icetexanos aislados de <i>Salvias</i> (<i>Calosphace</i>) de las secciones <i>Erythrosthachys</i> y <i>Tomentallae</i>	8
8. Funcionalidades de algunos clerodanos aislados de EGS (<i>Calosphace</i>)	9
9. Clerodanos modificados, aislados de EGS	9
10. Sesquiterpenos aislados de EGS	10
11. Tipos de triterpenos aislados de EGS	10
12. Estructura de la infuscatina, aislada de <i>S. infuscata</i>	11
13. Diterpenos aislados de varios especímenes de <i>Salvia fulgens</i>	12
14. Diterpenos aislados de <i>Salvia lineata</i>	12
15. Diterpenos aislados de dos variedades de <i>Salvia microphylla</i>	13
16. Metabolitos aislados de un espécimen de <i>Salvia microphylla</i> cultivada en Turquía	13
17. Estructura de la salvinorina A y de algunos de sus derivados que presentan afinidad selectiva por los receptores opioides	15
18. Grupos funcionales modificados en la salvinorina A para la obtención de derivados	15
19. Clerodanos de <i>S. splendens</i> y <i>S. farinacea</i> evaluados en el ensayo de afinidad por los receptores opioides	16
20. Variaciones estructurales de clerodanos evaluados como disuasorios de la alimentación en insectos	17
21. Clerodanos con actividad antialimentaria	18
22. Clerodanos activos contra bacterias Gram positivo	18
23. Clerodanos activos contra bacterias Gram negativo	19
24. Clerodanos con actividad antiinflamatoria	20
25. Clerodanos con actividad antiprotozoaria	21
26. Clerodanos con actividad tripanocida	21
27. Clerodanos con actividad citotóxica aislados de <i>Caesaria membranosa</i> y <i>C. silvestris</i>	22
28. Diterpenos tipo clerodano con actividad citotóxica aislados de <i>Caesaria obliqua</i>	22
29. Diterpenos con actividad citotóxica aislados de <i>Scutellaria barbata</i>	23
30. Diterpenos tipo clerodano con actividad citotóxica aislados de <i>Premna tomentosa</i>	23
31. Metabolitos aislados del extracto de acetona de <i>S. herbacea</i>	39

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
32. Correlaciones homo y heteronucleares observadas para el compuesto 1	40
33. Correlaciones NOESY observadas para el compuesto 1	41
34. Diagrama ORTEP del compuesto 6	44
35. Correlaciones homo y heteronucleares observadas para el compuesto 4	45
36. Correlaciones homo y heteronucleares observadas para el compuesto 5	45
37. Correlaciones NOE observadas para el compuesto 5	46
38. Estructura del derivado bromado 12	46
39. Diagrama ORTEP del compuesto 12	47
40. Principales correlaciones homo y heteronucleares observadas para 7	48
41. Proyección ORTEP del compuesto 7	49
42. Principales correlaciones NOE observadas para el compuesto 7	49
43. Principales correlaciones bidimensionales observadas para 8	50
44. Estructura del compuesto 13	51
45. Estructura de la 7,4'-dimetoxi-5,6,3'-trihidroxifalvona (10)	51
46. Diterpenos aislados de la hojas de <i>Salvia shannoni</i> J. D. Smith	53
47. Principales correlaciones COSY y HMBC observadas para el compuesto 20	55
48. Principales correlaciones COSY y HMBC observadas para el compuesto 16	56
49. Correlaciones NOE observadas para 16	57
50. Correlaciones homo y heteronucleares observadas para 19	57
51. Correlaciones NOE observadas para 19	59
52. Diagrama ORTEP del compuesto 19	59
53. Correlaciones observadas en los espectros COSY y HMBC de 18	60
54. Principales correlaciones homo y heteronucleares observadas para 15	60
55. Correlaciones NOE observadas para 15	61
56. Correlaciones observadas para 22 en los espectros COSY y HMBC	62
57. Correlaciones NOE observadas para 22	63
58. Diterpenos aislados de las hojas y flores de <i>Salvia microphylla</i> Kunth.	64
59. Correlaciones homo y heteronucleares de 23	65
60. Diagrama ORTEP del compuesto 24	67
61. Correlaciones COSY y HMBC observadas para 26	68
62. Diagrama ORTEP de 26	68
63. Correlaciones NOE observadas para 25 y la linearolactona	69
	IX

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
64. Diferencias estructurales entre la linearolactona y 25	69
65. Correlaciones NOE observadas para 27	70
66. Estructuras de los <i>neo</i> -clerodanos evaluados en el modelo antiinflamatorio de TPA	72
67. Estructuras de los diterpenos evaluados contra <i>E. histolytica</i> y <i>G. lamblia</i>	74

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Usos de especies del género <i>Salvia</i> en la medicina tradicional mexicana	3
2. Desplazamientos químicos en RMN ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) para los compuestos 1-3 y 6 , determinados en CDCl_3	43
3. Tabla 3. Desplazamientos químicos en RMN ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) para los compuestos 4-5 y 9 , determinados en CDCl_3	48
4. Desplazamientos químicos en RMN ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) para los compuestos 7, 8, 11 y 13 , determinados en CDCl_3	52
5. Desplazamientos químicos de RMN ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) de los compuestos 14, 20 y 21	55
6. Desplazamientos de RMN ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) para los compuestos 16-19 , determinados en CDCl_3	58
7. Desplazamientos de RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) para los compuestos 15 y 22 , determinados en CDCl_3	63
8. Desplazamientos de RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) para los compuestos 23, 24 y 26 , determinados en CDCl_3	66
9. Desplazamientos de RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) para la linearolactona , los compuestos 25 y 27 , determinados en CDCl_3	71
10. Inhibición de la inflamación en el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón	73
11. Inhibición en la producción de nitritos por la <i>i</i> NOS	73
12. Resultados de actividad antiprotozoaria	75
13. Inhibición del crecimiento celular en líneas de carcinomas humanos	76

1. INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas con fines medicinales ha estado presente en diversas civilizaciones antiguas y se ha mantenido durante miles de años a través del conocimiento empírico adquirido y transmitido de generación en generación. En la actualidad, un gran número de especies vegetales son usadas para tratar distintos padecimientos, debido a que las plantas contienen metabolitos con gran diversidad estructural. Con la ayuda de las técnicas de separación y caracterización modernas, los productos naturales se convierten en una fuente inagotable de nuevos agentes terapéuticos.¹ Algunos de los campos en los que ha destacado de manera importante la química de productos naturales, es en el descubrimiento de anticancerígenos, antihipertensivos y antimaláricos.²

Por su parte, las especies de la familia Lamiaceae (antes Labiatae) son ampliamente usadas en la medicina tradicional de varios países como China, Irán, México y Turquía. Muchas de estas especies proporcionan una alternativa médica para tratar padecimientos neurológicos, respiratorios, cardíacos y gastrointestinales. Además, algunas labiadas son de importancia económica debido a su uso como condimentos y por su uso en la industria de la perfumería.³

De los 220 géneros que conforman a la familia de las Lamiaceas, el género *Salvia* destaca por su uso en la medicina tradicional. Generalmente el efecto biológico que presentan las especies de este género se debe a su contenido de diterpenos⁴ o a sus aceites esenciales.⁵ En el caso particular de la medicina tradicional mexicana, varias especies de *Salvia* son usadas para el tratamiento de distintos padecimientos gastrointestinales, para tratar infecciones y trastornos del sistema nervioso central.⁶⁻⁸

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades sobre el género *Salvia*

El género *Salvia* agrupa al mayor número de especies de la familia Lamiaceae con aproximadamente 900 especies⁹ de un total de 5600¹⁰ y está dividido en 4 subgéneros: *Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* y *Calosphace* (Bentham).¹¹ Esta subdivisión en subgéneros considera las características morfológicas y distribución geográfica de las especies del género.

El subgénero *Salvia* agrupa a las especies distribuidas en Europa, el subgénero *Sclarea* a las especies de *Salvia* asiáticas, en el subgénero *Leonia* se encuentran las especies norteamericanas y el subgénero *Calosphace* contiene a las especies con distribución en México, centro y sur de América.¹²

Por su parte, el subgénero *Calosphace* está formado por más de 500 especies agrupadas en 105 secciones (Epling),¹² 312 de las especies de este género se encuentran distribuidas en México, de las cuales 75 se encuentran en el estado de Chiapas.¹⁰

En el presente trabajo se estudiaron químicamente tres especies del género *Salvia* (*Calosphace*):¹²

Salvia herbacea Benth. (Sección *Bracteata*)

Salvia shannoni J. D. Smith (Sección *Donnellsmithia*)

Salvia microphylla Kunth (Sección *Fulgentes*)

2.2 Usos etnobotánicos de especies del género *Salvia*

El uso de especies de la familia Lamiaceae data de tiempos ancestrales, algunos de los principales géneros de esta familia usados en la medicina tradicional son: *Ajuga*, *Coleus*, *Rabdosia*, *Scutellaria*, *Salvia* y *Teucrium*,⁴ destacando el género *Salvia* debido al número de especies que posee y a la gran variedad de metabolitos que son aislados de estas especies.

Por ejemplo, *Salvia miltiorrhiza* es una planta que se usó en la antigua medicina tradicional China y aun se sigue usando, la raíz seca de esta especie es conocida como “*Danshen*” y en la actualidad es uno de los medicamentos herbolarios más versátiles de la medicina China. Los usos que se le dan a la raíz son: para el tratamiento de desórdenes vasculares y cardíacos, anormalidades en el proceso de coagulación sanguínea, así como hiperlipidemia.¹³

De la raíz de *S. miltiorrhiza* se han aislado aproximadamente 70 metabolitos secundarios,¹³ entre los cuales, las tanshinonas (Figura 1) son los componentes mayoritarios y a los que recientemente se les han encontrado efectos farmacológicos importantes como son: antibacteriano, antiinflamatorio, antioxidante, antitumoral, antiviral, cardioprotector e inhibidor de la agregación plaquetaria.¹³⁻¹⁴

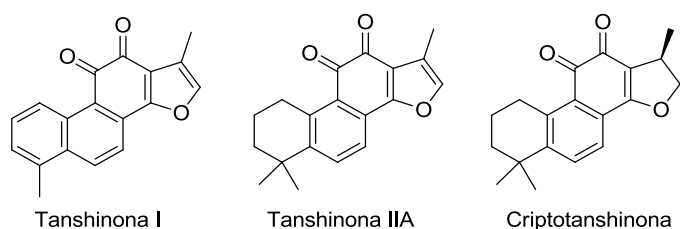


Figura 1. Diterpenos mayoritarios aislados de *Salvia miltiorrhiza*.

Algunos de los usos que tienen las especies del género *Salvia* en la medicina tradicional mexicana se muestran en la Tabla 1.^{6-8, 15-16}

Tabla 1. Usos de especies del género *Salvia* en la medicina tradicional mexicana.

Especie	Nombres populares	Usos	Ref.
<i>Salvia adenophora</i>	Mirto	Diarrea	6
<i>S. amarissima</i>	Ñadri (otomí)	Reumas	6
<i>S. coccinea</i>	Sajanich huamal, mirto cimarrón	Disentería, infecciones en los ojos, sangrado nasal	6, 7
<i>S. divinorum</i>	Pastora	Rituales de adivinación, diarrea, dolor de cabeza y reumatismo	15
<i>S. elegans</i>	Mirto, Jetcho deni	Tos, insomnio, sarampión	6
<i>S. fulgens</i>	Mirto	Insomnio	6
<i>S. hispanica</i>	Chía	Dolor	8
<i>S. lavanduloides</i>	Bacal nichz, lucuma	Tos, bronquitis,	6
<i>S. leucantha</i>	Lana, cordón de San Francisco, salvia real	Abortivo, anticonceptivo, fiebre	6, 8
<i>S. longispicata</i>	Chía	Anticonceptivo, granos	6
<i>S. mexicana</i>	Marrubio	Cólicos, diarrea	6
<i>S. microphylla</i>	Mirto	Dolor de estómago, empacho, problemas menstruales, cólicos, diarrea, insomnio y disminución de la ansiedad.	6, 8
<i>S. pinguifolia</i>	Peistón	Diarrea	6
<i>S. polystachya</i>	Alchichía, hierba chica	Cólicos, diarrea, antiséptico	6, 7
<i>S. regia</i>	Aretillo	Resfriado	6
<i>S. regla</i>	Almaraduz grande	Mareos	6
<i>S. reptans</i>	Hierba de la golondrina, hierba de pozuña	Antiséptico, diarrea, infección	6, 8
<i>S. shannoni</i>	Monte amargo	Malaria	16
<i>S. xalapensis</i>	Padejen ujts (mixe)	Granos	6

La especie *Salvia herbacea*, estudiada en este trabajo, no cuenta con usos descritos en la medicina tradicional. Para el caso de *Salvia shannoni*, la especie tiene el nombre popular de “monte amargo” y uso en la medicina tradicional de El Salvador.¹⁶ En la Tabla 1 se indica que *S. microphylla* es una especie ampliamente utilizada en la medicina tradicional de México, esta especie está agrupada en la sección *Fulgentes*.⁵ De algunas de las especies del género *Salvia* que pertenecen a esta sección se han aislado diterpenos con esqueleto carbonado de clerodano modificado, motivo que incrementa la importancia de su estudio.

2.3 Química del género *Salvia*

Las especies del género *Salvia* poseen una composición química bastante diversa, entre sus metabolitos secundarios han sido aislados: compuestos fenólicos, flavonoides y principalmente compuestos terpenoides, de los cuales se han encontrado mono, sesqui, di, sester y triterpenos.

2.3.1 Compuestos fenólicos

La biosíntesis de los compuestos fenólicos se lleva a cabo a través de la ruta del ácido siquímico¹⁷ y son los componentes mayoritarios de la fracción soluble en agua obtenida por decocción de las partes aéreas de especies del género *Salvia*.¹⁸ Los compuestos fenólicos aislados de estas especies están representados principalmente por los ácidos salvianólicos (Figura 2), ácidos fenólicos simples y glicósidos fenólicos.

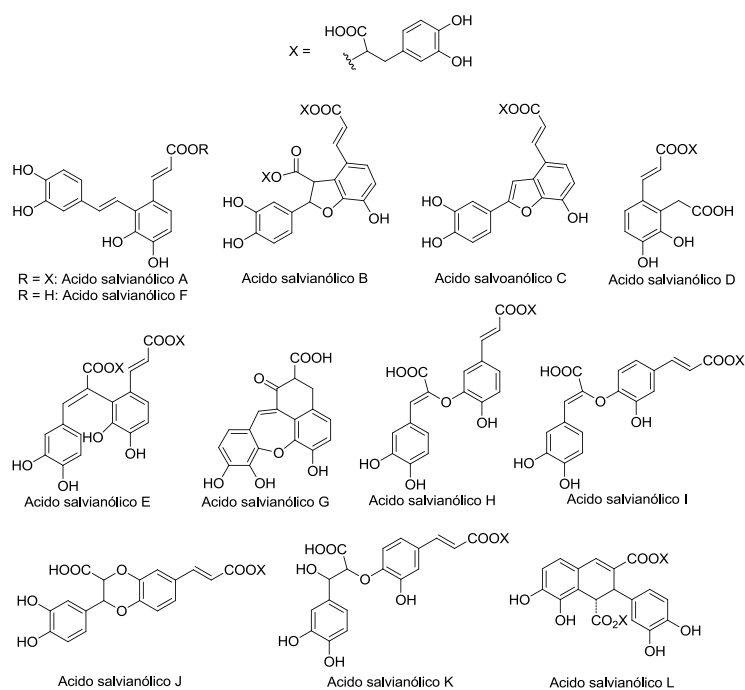


Figura 2. Ácidos salvianólicos aislados de especies del género *Salvia*.

Entre los ácidos fenólicos se encuentran monómeros, dímeros, trímeros y tetrameros del ácido cafeico (Figura 3). Los glicósidos fenólicos por su parte, son bastante raros y están conformados por glucósidos de 4-hidroxiacetofenona, ácido ferúlico y ácido cafeico (Figura 3), entre otros.¹⁸

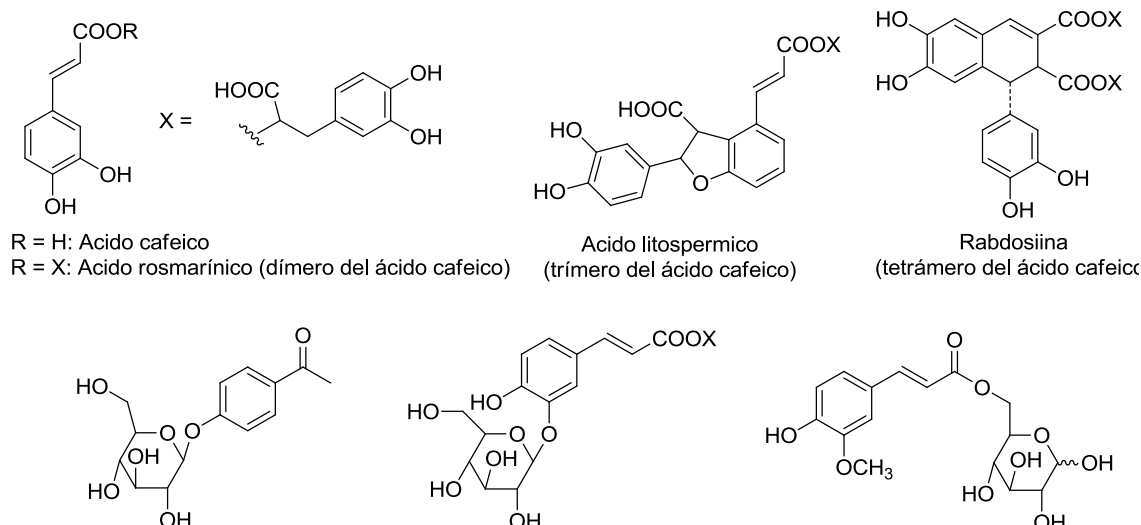


Figura 3. Oligómeros del ácido cafeico y glicósidos fenólicos aislados de especies del género *Salvia*.

2.3.2 Flavonoides

Los compuestos flavonoides se producen a través de una biosíntesis mixta, es decir, un fragmento del esqueleto de flavonoide es generado por medio de la vía del acetato y el otro se genera por la vía del ácido siquímico. Estos compuestos están ampliamente distribuidos en prácticamente todas las plantas y tienen una amplia gama de actividades biológicas.¹⁷

Los principales flavonoides aislados de especies del género *Salvia* son: flavonas, flavonoles, glicósidos de flavonas, glicósidos de flavonoles y antocianinas. Las flavonas comúnmente aisladas son apigenina, luteolina (Figura 4) y sus respectivos derivados hidroxilados en C-6 del esqueleto de flavona. Los flavonoles que comúnmente se han aislado son: kaempferol, quercetina (Figura 4) y sus respectivos derivados metoxilados en C-3 y C-3', así como flavonoles hidroxilados en C-6. Los glucósidos de flavona, pueden estar *O*-glicosidados en C-6, C-7, C-3' y C-4'. Adicionalmente, los flavonoles glicosidados presentan *O*-glicosidación en C-3 casi de forma exclusiva. También se han aislado *C*-glicósidos de algunas especies de *Salvia* pero son menos comunes que los *O*-glicósidos. Por otra parte, las antocianinas son particularmente abundantes en las especies de *Salvia* de flores rojas o púrpura, de ellas

se han aislado la salvianina (Figura 4) y la monardaena; de algunas *Salvias* con flor color azul como *S. farinacea*, también se han aislado la malonilwobaina y la salviamalvina.¹⁸

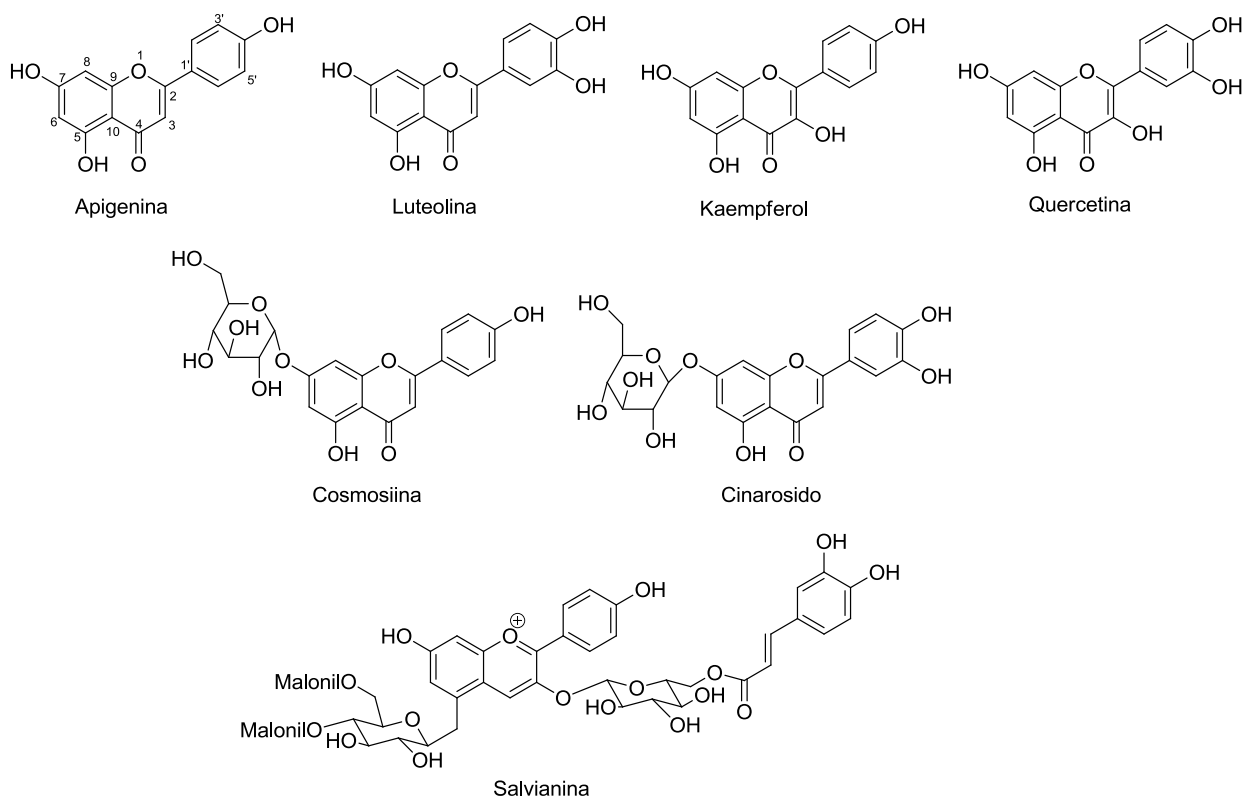


Figura 4. Flavonoides aislados de especies de *Salvia*.

2.3.3 Terpenoides

Los compuestos terpenoides, al igual que los flavonoides, están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Este tipo de metabolitos pueden producirse a través de dos vías metabólicas, la primera conocida como la ruta del ácido mevalónico y la segunda conocida como ruta del metileritritolfosfato (MEP) o DOXP. Los compuestos terpenoides tienen la particularidad de estar formados por una unidad básica de construcción llamada isopreno (5C), el tipo de compuesto terpenoide depende del número de unidades de isopreno que lo originaron (o número de átomos de carbono que presente en su esqueleto base), los cuales pueden ser: hemiterpenos (5C), monoterpenos (10C), sesquiterpenos (15C), diterpenos (20C), sesterterpenos (25C), triterpenos (30C) y tertraterpenos (40C).¹⁷

Los monoterpenos presentes en especies del género *Salvia* se encuentran en el aceite esencial de estas plantas y forma parte de los componentes volátiles de las mismas.¹⁹ Por otra parte, los sesquiterpenos en especies de *Salvia* son raros, sin embargo, recientemente ha aumentado la frecuencia con que son aislados

estos metabolitos de especies del género *Salvia*, que comúnmente son lactonas sesquiterpénicas de tipo eudesmanólida,²⁰ guayanólida,^{21,22} germacranólida²³ y algunos eudesmanos²⁰ (Figura 5).

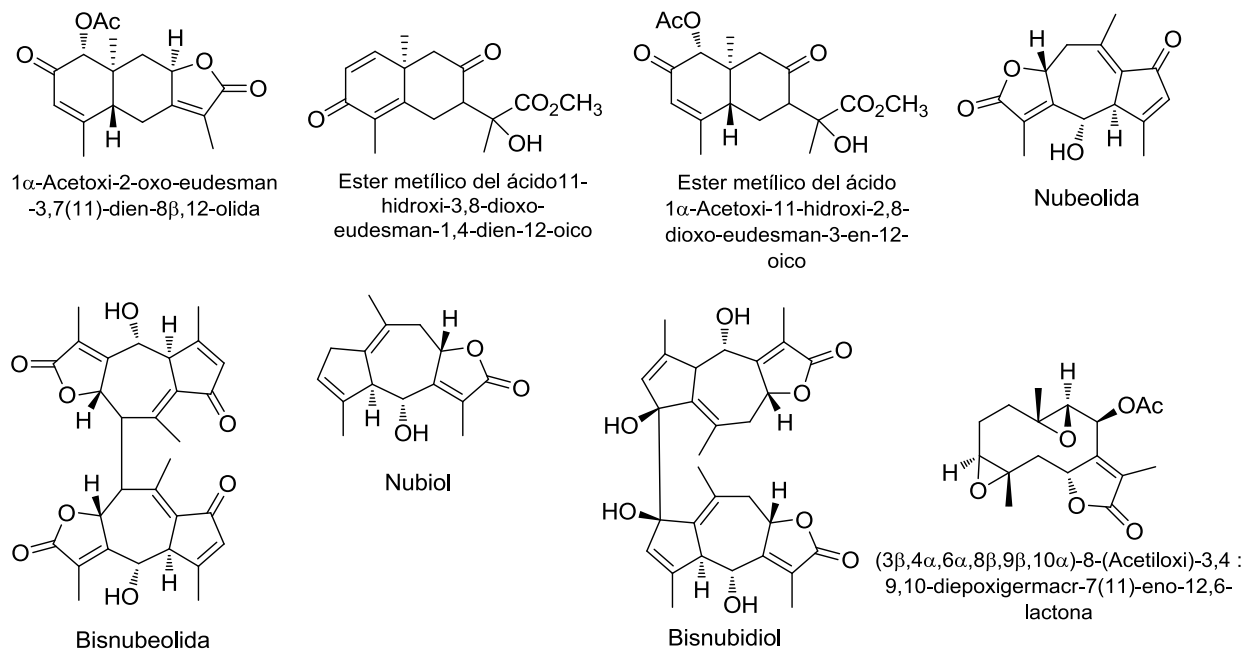


Figura 5. Sesquiterpenos aislados de especies del género *Salvia*.

Los diterpenos son los principales componentes aislados de especies de *Salvia* y pueden ser de tipo abietano, abietano modificado, clerodano y clerodanos modificados. El contenido y tipo de diterpenos en especies del género *Salvia* está estrechamente relacionado con la distribución geográfica de las diferentes especies y con su agrupación taxonómica, es decir la sección a la que pertenecen. Los diterpenos aislados de raíces y de las partes aéreas de especies de *Salvia* europeas y asiáticas poseen un esqueleto carbonado de abietano con el anillo C aromático u oxidado a α -hidroxi-*para*-quinona, como ejemplo de ello están el carnosol y la royleanona (Figura 6); también pueden tener oxidado el metilo 16 para dar lugar a furofenantreno-quinonas como las tanshinonas (Figura 6).⁴ Los diterpenos aislados de especies del género *Salvia* norteamericanas (subgénero *Leonia*) poseen esqueletos de abietano y clerodano.²⁴

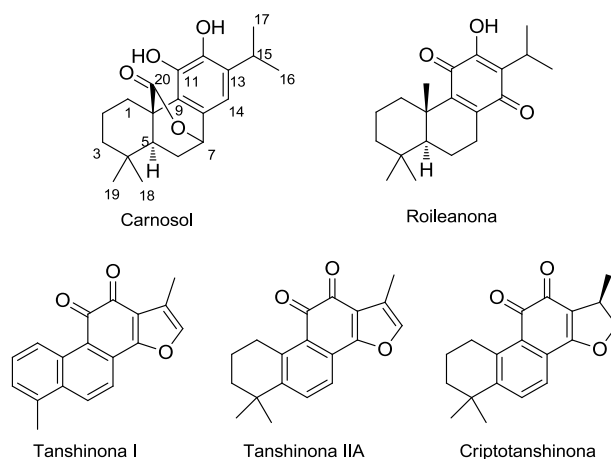


Figura 6. Abietanos aislados de *Salvias* con distribución en Asia y Europa.

En lo que respecta a especies del género *Salvia* pertenecientes al Subgénero *Calosphace*, aproximadamente el 80% de los diterpenos aislados posee un esqueleto de clerodano o clerodano modificado,²⁴ con excepción de las especies pertenecientes a las secciones *Erytrostachys* y *Tomantallae*, de las cuales se han aislado abietanos como la conacytona y la sesseina, así como abietanos modificados como son la icetexona y la anastomosina (Figura 7).²⁵

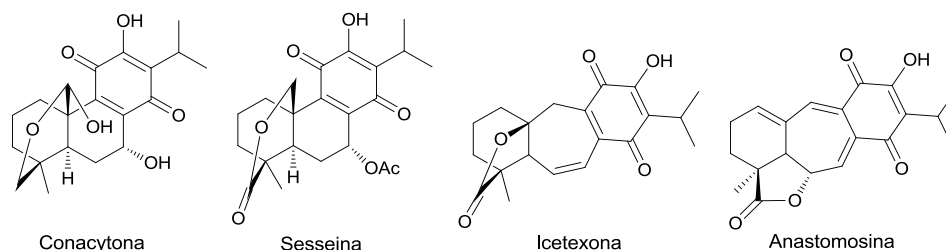


Figura 7. Abietanos e icetexanos aislados de *Salvias* (*Calosphace*) de las secciones *Erytrostachys* y *Tomantallae*.

Los diterpenos de tipo clerodano aislados de especies del género *Salvia* son casi exclusivamente *neo-clerodanos*, con algunas excepciones como la cardiophylidina (Figura 8), aislada de *S. cardiophylla*²⁶ y pueden presentar las siguientes funcionalidades (Figura 8):⁴

- 1) Una 18,19 γ -lactona α,β -insaturada
- 2) Una 13,16- α o β -butenólida con los metilos 20 y 17 sin oxidar
- 3) Una 12,17 δ -lactona
- 4) Un grupo hidroxilo o acetoxilo axial en C7.

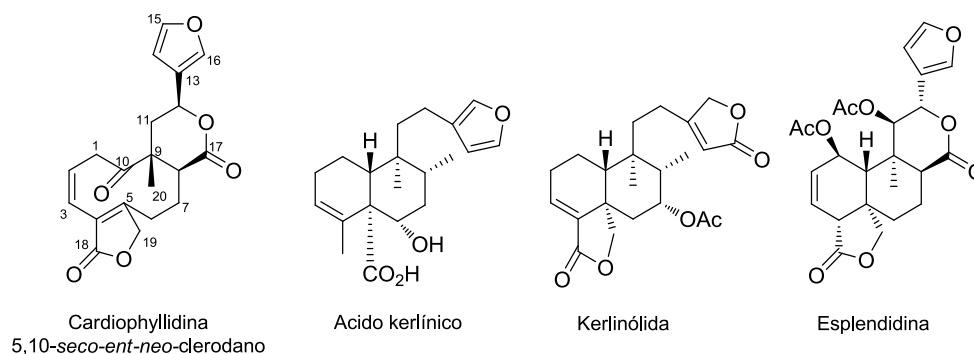


Figura 8. Funcionalidades de algunos clerodanos aislados de especies del género *Salvia* (*Calosphace*).

Los clerodanos modificados poseen rearrreglos carbonados poco comunes, dando origen a nuevos esqueletos²⁴ como los icetexanos que se originan a partir del abietano.²⁵ Los diterpenos cuyo esqueleto se origina a partir del clerodano son: languidulano, riacofano, salvigenano, salvilanguidulano, salvipuberulano, isosalvipuberulano y tilifolano. La estructura de estos clerodanos modificados se muestra en la Figura 9.²⁴

Adicionalmente, en años recientes se han aislado otros clerodanos modificados, aumentando así el número de esqueletos carbonados que se originan a partir del clerodano, ellos son: salvixalapeno,²⁷ salvileucalano,²⁸ tipo salvileucalina B,²⁹ y tipo salvileucalina C (Figura 9).³⁰

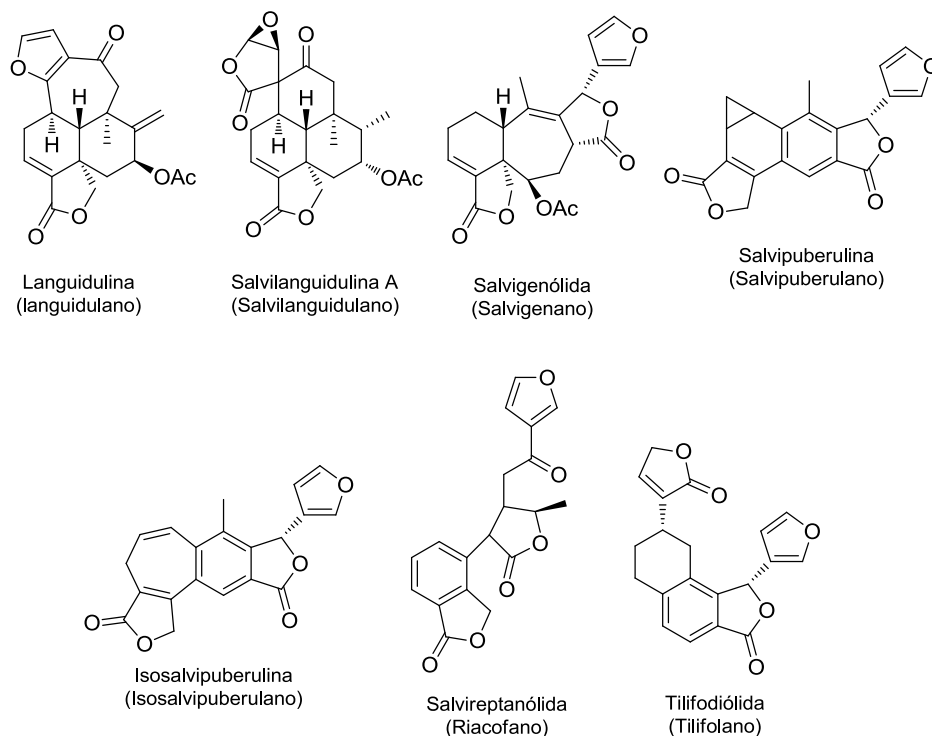


Figura 9. Clerodanos modificados, aislados de especies del género *Salvia*.

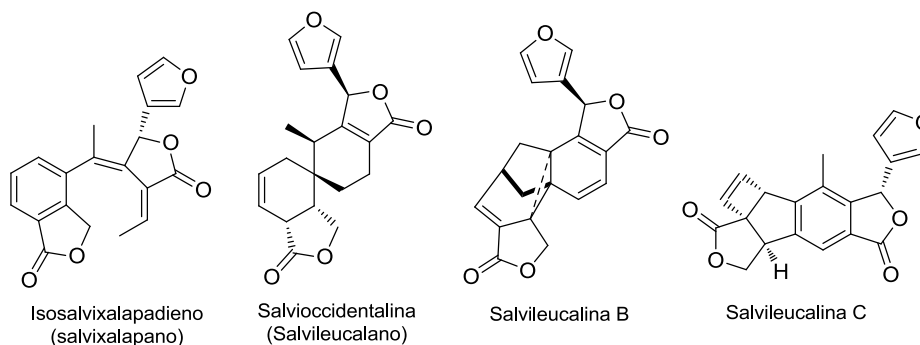


Figura 9. Clerodanos modificados, aislados de especies del género *Salvia* (continuación).

Los sesterterpenos son compuestos de 25 átomos de carbono, este tipo de metabolitos son poco comunes en la naturaleza, han sido aislados principalmente de esponjas marinas y algas. Para el caso de especies del género *Salvia*, hasta el año 2010 sólo se habían aislado este tipo de metabolitos de nueve especies.³¹ La estructura de algunos de los sesterterpenos aislados de estas especies se muestran en la Figura 10.³¹⁻³⁶

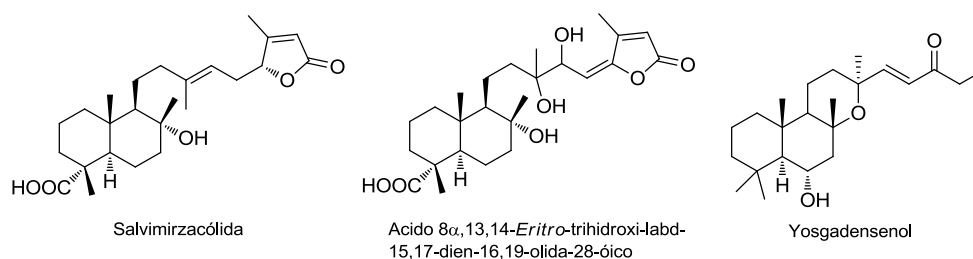


Figura 10. Sesterterpenos y un bisnorsesterterpeno aislados de especies de *Salvia*.

En lo referente a triterpenos, son componentes abundantes y comúnmente encontrados en especies del género *Salvia*. Los principales tipos de triterpenos aislados de estas especies son aquellos con esqueleto de damarano,³⁷ lupano,³⁸ oleanano³⁹ y ursano.⁴⁰ Además, recientemente han sido aislados nuevos compuestos con esqueletos de triterpenos con una complejidad estructural y propiedades biológicas bastante interesantes (Figura 11).⁴¹⁻⁴²

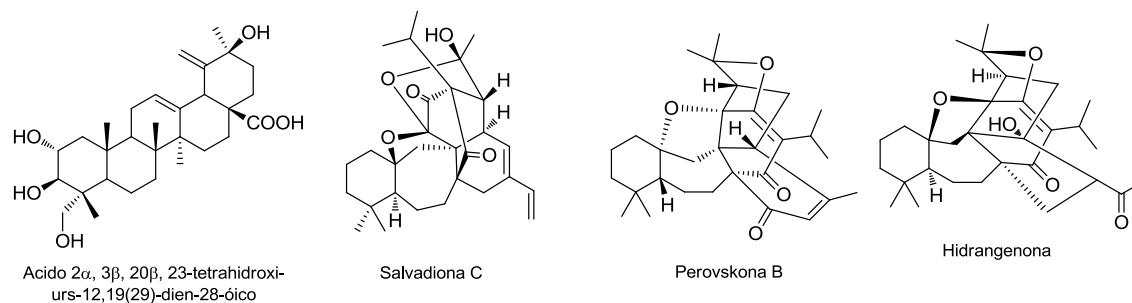


Figura 11. Tipos de triterpenos aislados de EGS.

2.4 Estudios químicos previos de especies taxonómicamente relacionadas del género *Salvia*

La química de las especies del género *Salvia* está estrechamente relacionada con su clasificación taxonómica^{4, 24-25} y debido a que las tres especies de *Salvia* que fueron estudiadas en el presente trabajo pertenecen a diferentes secciones, se hizo una revisión de los estudios químicos de especies relacionadas.

2.4.1 *Salvia herbacea* Benth.

Esta especie pertenece a la sección *Bracteata*, la cual es monoespecífica, es decir, está constituida únicamente de *S. herbacea*. A la fecha no hay estudios químicos, ni usos en la medicina tradicional reportados para esta especie.

2.4.2 *Salvia shannoni* J. D. Smith

Pertenece a la sección *Donnellsmithia*. Esta sección está conformada por cuatro especies: *S. collinsii*, *S. infuscata*, *S. kellermanii* y *S. shannoni*. De las cuatro especies, sólo *S. infuscata* ha sido estudiada y de esta especie se aisló un diterpeno con esqueleto de *neo-clerodano* al que se le dio el nombre de infuscatina (Figura 12).⁴³

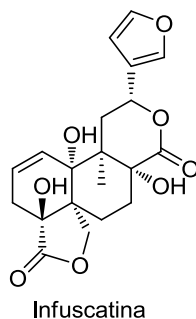


Figura 12. Estructura de la infuscatina aislada de *S. infuscata*.

2.4.3 *Salvia microphylla* Kunth

Esta especie está agrupada en la sección *Fulgentes*, consta de 6 especies, las cuales son: *S. dichlamys*, *S. fulgens*, *S. lineata*, *S. modica*, *S. microphylla* y *S. pullchella*. De esta sección han sido estudiadas químicamente: *S. fulgens*, *S. lineata* y *S. microphylla*.⁴⁴⁻⁵¹ A continuación se describen los estudios de la composición química de cada una de estas especies.

Salvia fulgens Cav. es la primera especie del género *Salvia* de la que se aislaron diterpenos con esqueleto de pimarano⁴⁴, adicionalmente se aisló un diterpeno con esqueleto carbonado de clerodano modificado, al cual se le dio el nombre de salvigenenano; la estructura que representa a este tipo de esqueleto es la salvigenólida⁴⁵ (Figura 13). También, en un estudio químico reciente de *S. fulgens* Cav. cultivada en Japón, se aislaron cinco diterpenos de tipo clerodano y un salvixalapano⁴⁶ (Figura 13).

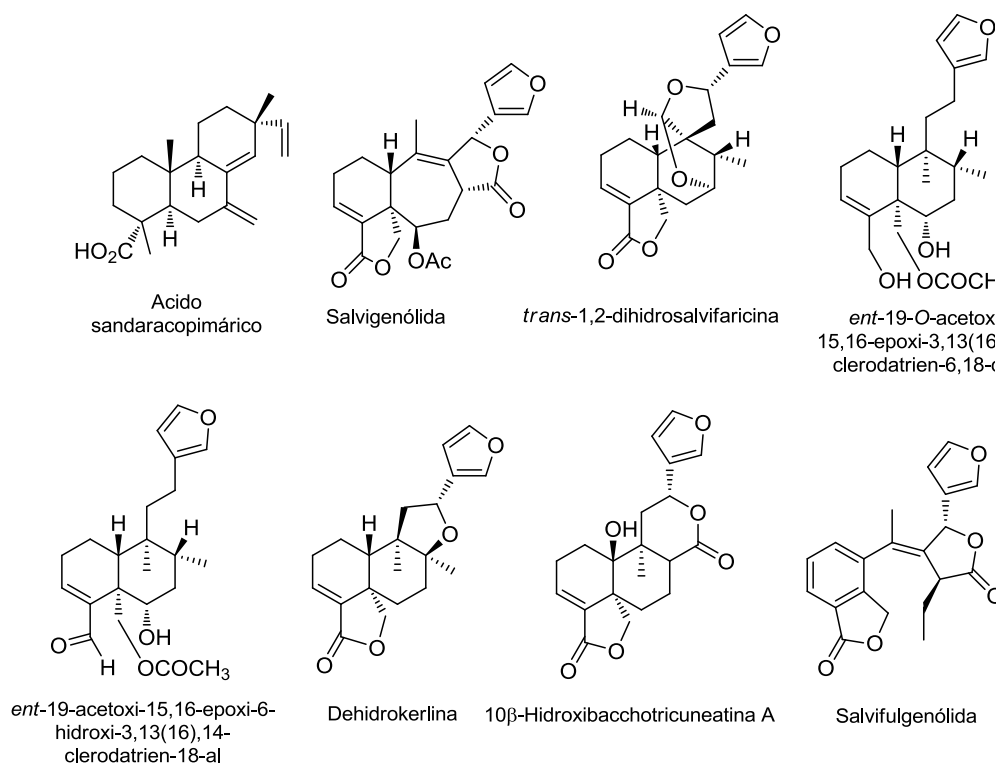


Figura 13. Diterpenos aislados de varios especímenes de *Salvia fulgens*.

Salvia lineata Benth. es un arbusto endémico de México, se trabajó con dos poblaciones de esta planta, una de ellas recolectada en Tehuacán, Puebla y la otra en el estado de Oaxaca. El estudio químico de las dos poblaciones condujo al aislamiento de 3 diterpenos con esqueleto de neo-clerodano (Figura 14).⁴⁷⁻⁴⁸

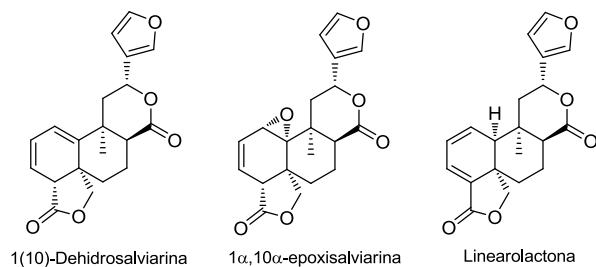


Figura 14. Diterpenos aislados de *Salvia lineata*.

La especie *Salvia microphylla* está conformada por tres variedades¹², éstas son: *S. microphylla* var. *microphylla* Kunt, *S. microphylla* var. *neurepia* Epl. y *S. microphylla* var. *wizlizeni* Gray. Las variedades *microphylla* y *neurepia* son ampliamente usadas en la medicina tradicional del valle de México por varios grupos étnicos como: antihelmíntico, antiséptico, antiespasmódico y antidiarreico.⁴⁹ Las variedades *microphylla* y *neurepia* también han sido estudiadas químicamente. De la variedad *microphylla* se aislaron tres pimaranos y un clerodano (Figura 15).⁴⁴ De la variedad *neurepia* sólo se aislaron pimaranos (Figura 15).⁵⁰

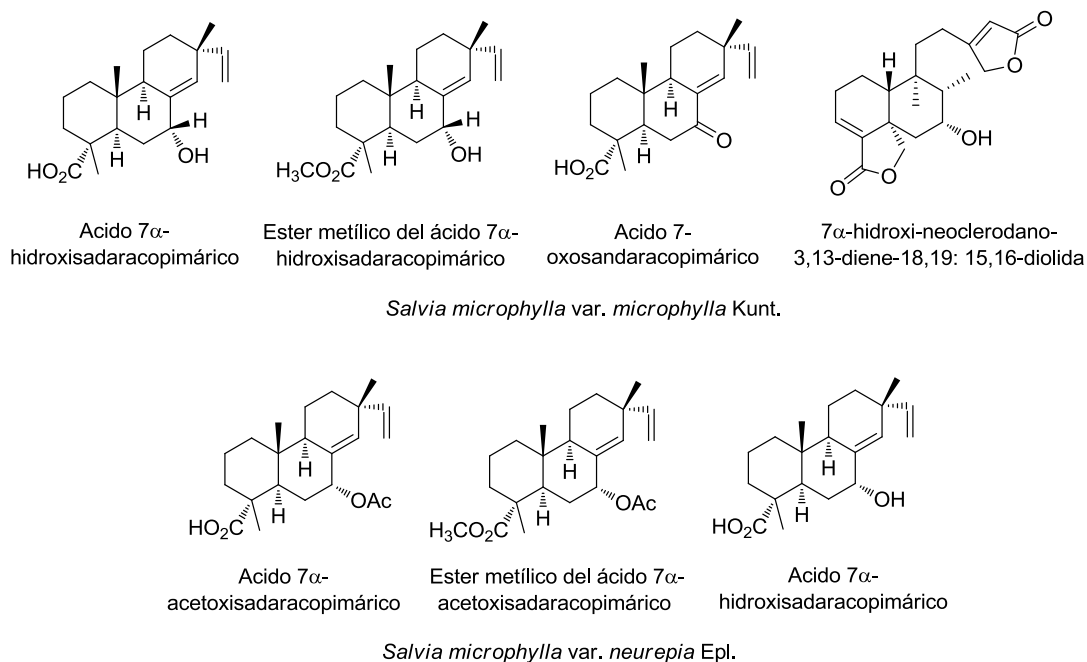


Figura 15. Diterpenos aislados de dos variedades de *Salvia microphylla*.

Adicionalmente, de un espécimen de *S. microphylla* cultivado en Turquía, se aislaron: dos ésteres fenólicos, dos sesquiterpenos de tipo eudesmano y un diterpeno de tipo abietano (Figura 16).⁵¹

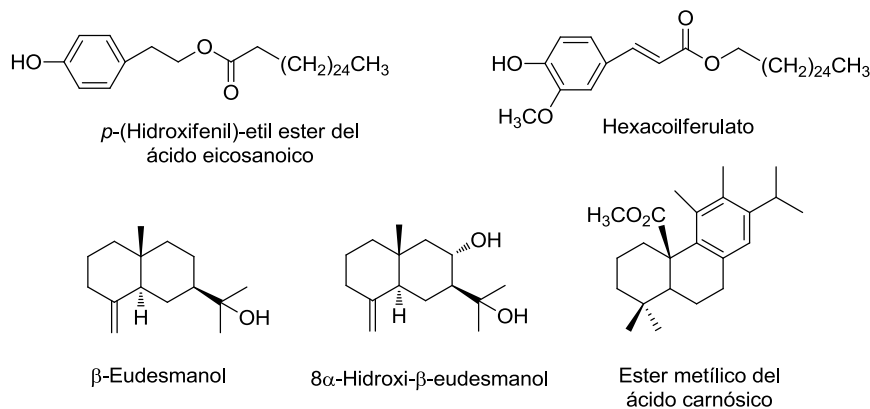


Figura 16. Metabolitos aislados de un espécimen de *Salvia microphylla* cultivado en Turquía.

2.5 Propiedades biológicas de diterpenos con esqueleto de clerodano

Los diterpenos con esqueleto carbonado de clerodano poseen una gran variedad de actividades biológicas, las más comunes son: afinidad por los receptores opioides,⁵²⁻⁶⁰ antialimentaria,⁶¹⁻⁶⁹ antibacteriana,⁷⁰⁻⁷⁷ antiinflamatoria,⁷⁸⁻⁸¹ antiprotozoaria,⁸²⁻⁹¹ y citotóxica.⁹²⁻⁹⁶ Cada actividad biológica de estos componentes es discutida a continuación, independientemente de la fuente natural de la cual han sido aislados.

2.5.1 Afinidad por los receptores opioides

La afinidad hacia los receptores opioides de diterpenos de tipo clerodano fue descubierta en el año 2002⁵² como respuesta a la búsqueda del mecanismo de acción de la salvinorina A, un clerodano aislado de *Salvia divinorum*.⁵³ Esta especie es usada por los mazatecos de Oaxaca para tratar varios padecimientos como anemia, dolor de cabeza, diarrea y reumatismo. También es usada en ritos mágicos religiosos debido al efecto alucinógeno que produce la planta al masticar las hojas frescas o ingerir una infusión de sus hojas.⁵⁴ Posterior a la determinación del mecanismo de acción de la salvinorina A, se llevó a cabo la obtención de una gran cantidad de derivados de este compuesto y así como su síntesis total con la finalidad de encontrar posibles aplicaciones terapéuticas. Entre las aplicaciones se encuentran el tratamiento de abuso de sustancias como alcohol, cocaína, opiáceos, etc.,⁵⁵⁻⁵⁶ así como dolor, tos, diarrea y trastornos del estado de ánimo. Para el año 2008, se habían reportado aproximadamente 150 derivados de la salvinorina A, su síntesis total y el esclarecimiento de su ruta biogénica.⁵⁷ En la Figura 17 se muestran la estructura de la salvinorina A y de algunos de sus derivados que han mostrado elevada afinidad y selectividad por los receptores opioides.

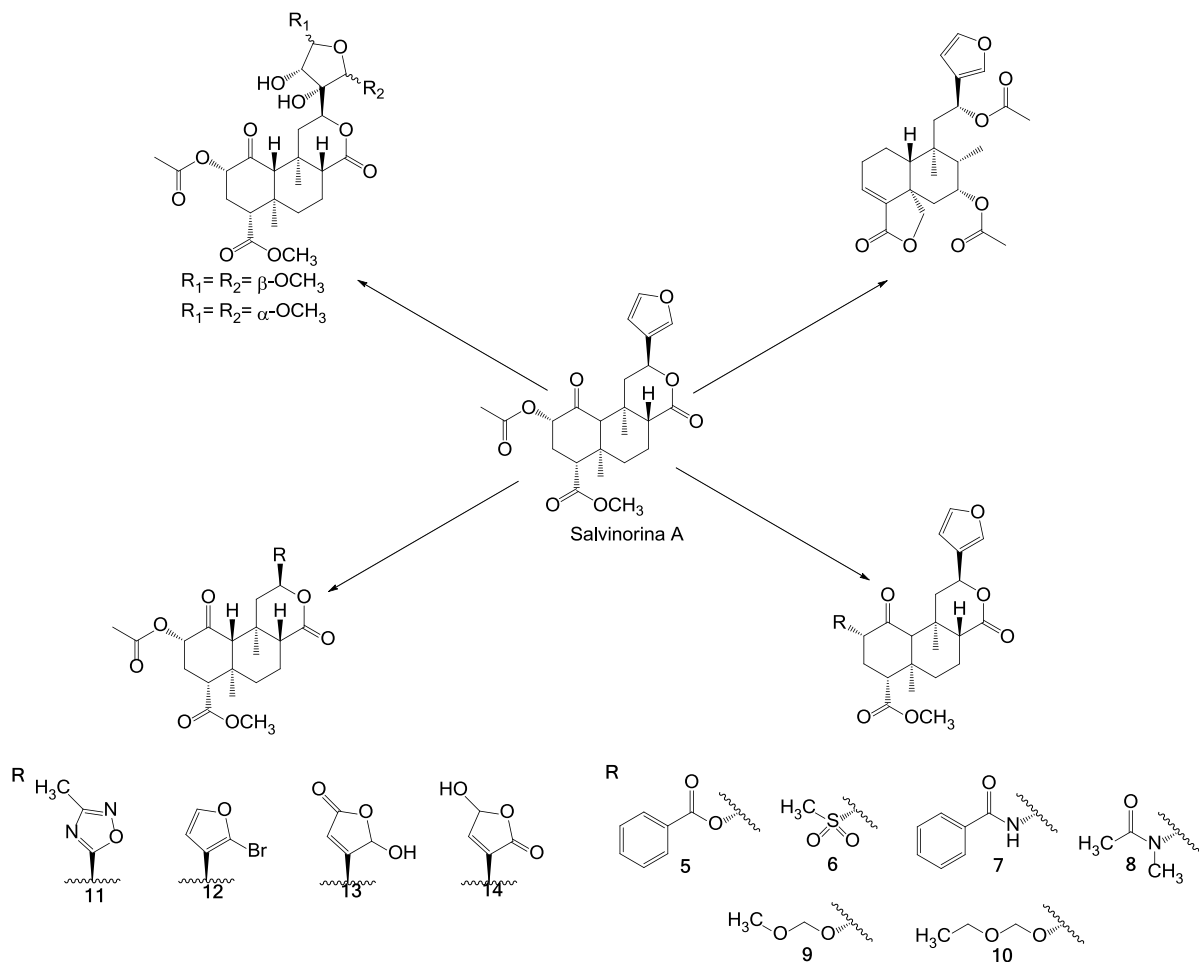


Figura 17. Estructura de la salvinorina A y de algunos de sus derivados que presentan afinidad selectiva por los receptores opioides.

Por otra parte, se han establecido relaciones entre la estructura de los derivados de la salvinorina A con su afinidad por los receptores opioides. En la Figura 18 se ilustran dichas correlaciones.⁵⁷

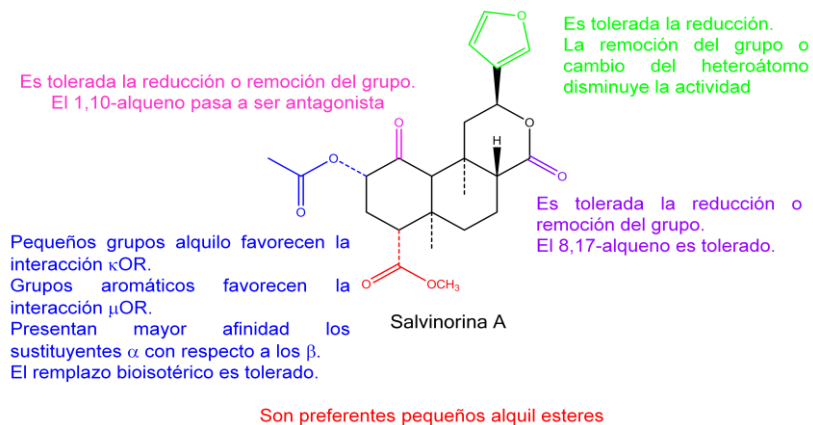


Figura 18. Grupos funcionales modificados en la salvinorina A para la obtención de derivados.

Adicionalmente, se ha evaluado la afinidad de clerodanos naturales por los receptores opioides, y algunos de sus derivados, aislados de otras especies de *Salvia*, como *Salvia splendens*⁵⁸⁻⁵⁹ y *Salvia farinacea*,⁶⁰ estos compuestos han mostrado nula o muy baja afinidad. Entre los clerodanos evaluados están la salviarina, la esplendina, la esplénolida B, las salvisplendinas A-D, la salvifarina y la salvifaricina (Figura 19).

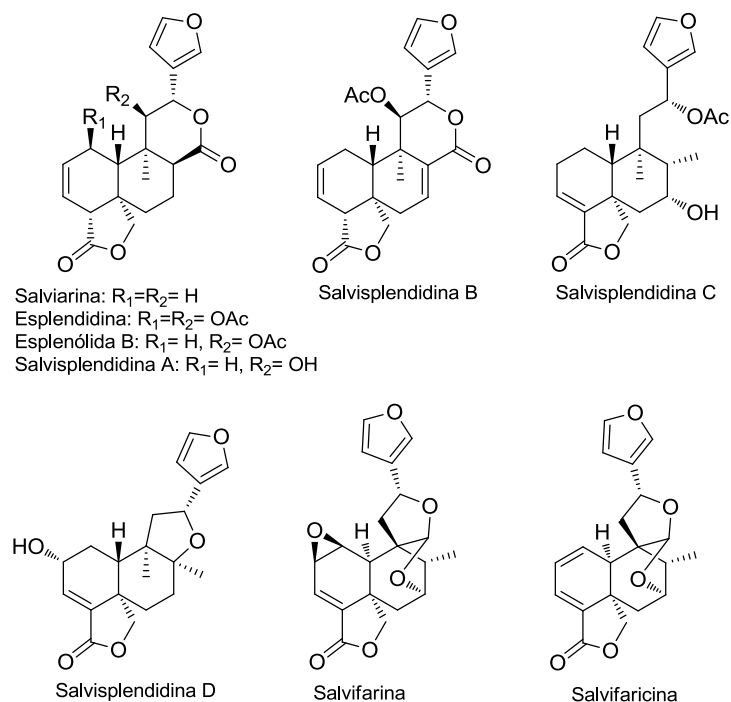


Figura 19. Clerodanos de *S. splendens* y *S. farinacea* evaluados en el ensayo de afinidad por receptores opioides.

2.5.2 Actividad antialimentaria

Esta actividad tiene importancia agrícola, su principal aplicación es en el control de insectos nocivos a través de la disuasión de la alimentación. Esta propiedad se ha evaluado contra especies de plagas de distintos cultivos, como son: *Diabrotica virgifera* (gusano de la raíz del maíz),⁶¹ *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la papa),⁶²⁻⁶² *Myzus persicae* (pulgón del melocotonero),⁶³ *Spodoptera littoralis* (rosquilla negra),⁶³⁻⁶⁵ *Tenebrio molitor* (gusano de la harina)⁶⁶⁻⁶⁷ y *Tribolium castaneum* (gorgojo castaño de la harina),⁶⁸ entre otros.

En una revisión hecha por Gebbinck y colaboradores en 2002,⁶⁹ se analizaron los resultados de actividad antialimentaria de aproximadamente 400 diterpenos de tipo clerodano (naturales y semisintéticos) contra diversos insectos. Las variaciones estructurales del esqueleto de clerodano que se evaluaron radican en el

tipo de cadena lateral en C-9 (Figura 20). Los requerimientos estructurales para la actividad antialimentaria inferidos de la revisión son los siguientes:

- 1) Los diterpenos activos generalmente poseen un esqueleto de *neo*-clerodano con la decalina *trans*-fusionada. Los clerodanos que poseen la decalina *cis*-fusionada y que presentan actividad antialimentaria se limitan a pocos casos.
- 2) Todos los clerodanos activos poseen un sistema anular oxigenado en la cadena lateral en C-9.
- 3) Para aumentar la actividad, los elementos estructurales (1) y (2) deben estar presentes de forma simultánea en una molécula.
- 4) Las moléculas activas son capaces de adquirir una conformación espacial distinta, esto se observa en los compuestos que tienen un anillo de oxirano entre C-4 y C-18 o una lactona insaturada con carbonilo en C-18.
- 5) La actividad antialimentaria se ve favorecida cuando el anillo A del clerodano tiene una conformación rígida de bote. Por otra parte, la actividad disminuye si el anillo A presenta una conformación de bote torcido.

Adicionalmente, la actividad antialimentaria es selectiva, esta selectividad depende del tipo de insecto y del estadio de vida en que se encuentre. Algunos de los clerodanos evaluados poseen actividad antialimentaria contra algún insecto en particular pero pueden o no presentar el mismo efecto contra otro tipo de insecto. En la Figura 21 se ilustran algunos clerodanos con potente actividad antialimentaria que cumplen con los parámetros estructurales anteriormente mencionados. Entre los clerodanos con mayor actividad para disuadir la alimentación de insectos están la 1(10)-dehidrosalviarina (contra *Diabrotica virgifera*⁶¹ y *Spodoptera littoralis*⁶⁴), la bacchotricuneatina A, la 7 α -hidroxibacchotricuneatina A (ambos contra *Tenebrio molitor*),⁶³ y la 6 β -hidroxisalviarina (contra *Spodoptera littoralis*).⁶⁴

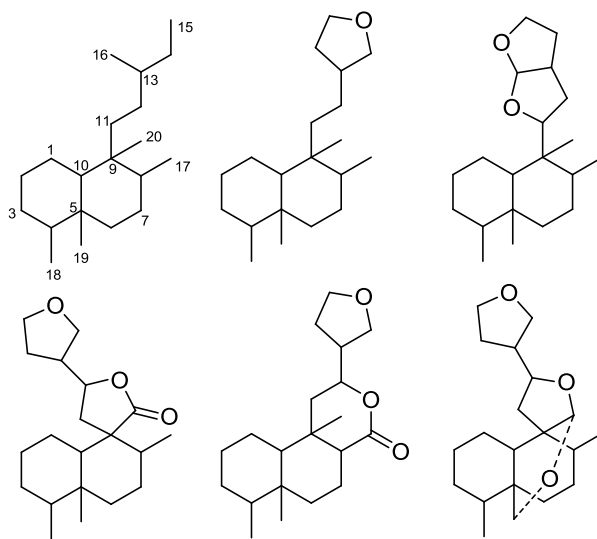


Figura 20. Variaciones estructurales de clerodanos evaluados como disuasorios de la alimentación en insectos.

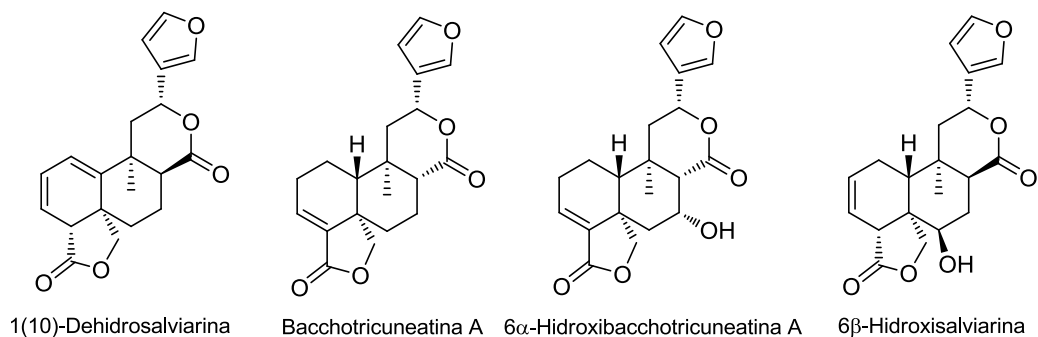


Figura 21. Clerodanos con actividad antialimentaria.

2.5.3 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de clerodanos no ha sido tan estudiada como la actividad antialimentaria, sin embargo, los pocos reportes existentes, indican que este tipo de metabolitos son activos contra bacterias Gram positivo y Gram negativo. Dentro de las bacterias Gram positivo destacan *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis* y *Micrococcus luteus*.⁷⁰⁻⁷¹ Esto es de suma importancia debido a la resistencia a antibióticos que presenta *S. aureus*,⁷² en los otros microorganismos estos estudios son relevantes debido a que comúnmente estos microorganismos son responsables de la contaminación microbiológica de alimentos.⁷³ En la Figura 22 se muestra la estructura de los ácidos solidagoicos, aislados de *Haplopappus foliosus*. Estos metabolitos fueron activos contra varias especies de *Bacillus* y *S. aureus*.⁷⁰⁻⁷¹

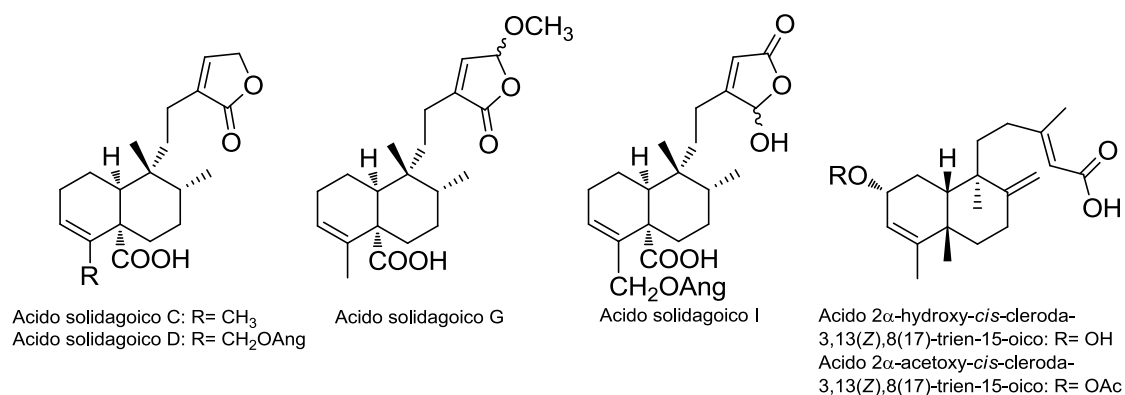


Figura 22. Clerodanos activos contra bacterias Gram positivo.

Muchas bacterias Gram negativo, son causantes de infecciones gastrointestinales en el ser humano, tal es el caso de *Salmonella typhi*, causante de la fiebre tifoidea⁷⁴ así como cepas patógenas de *Escherichia coli*, son causantes de cuadros diarreicos.⁷⁵ En este contexto, algunos clerodanos como los hativenos A-C y las

lupulinas A-B han sido activos contra *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. typhimurium*.⁷⁶ Las bafoudiosbulbinas A y B por su parte, son activas contra distintas especies de *Salmonella* (Figura 23).⁷⁷

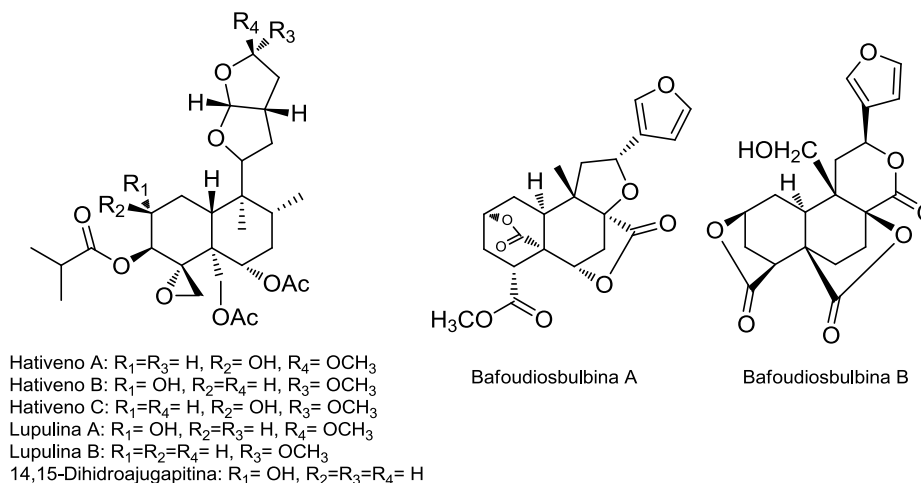


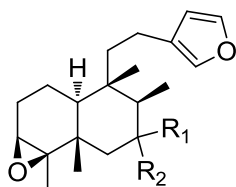
Figura 23. Clerodanos activos contra bacterias Gram negativo.

2.5.4 Actividad antiinflamatoria

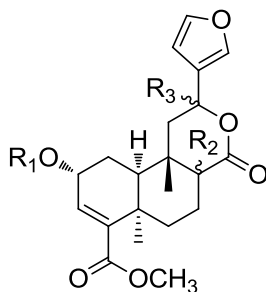
En lo referente a actividad antiinflamatoria de clerodanos, ésta, al igual que la actividad antibacteriana ha sido poco documentada. No obstante, los reportes existentes consideran diferentes metodologías farmacológicas para determinar este tipo de actividad. El principal método reportado para la evaluación antiinflamatoria es la inhibición de la producción de nitritos por la Oxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS), éste es un método indirecto para determinar la actividad antiinflamatoria. En este modelo han mostrado actividad significativa (Figura 24) el 3 β ,4 β :15,16-diepoxi-13(16),14-clerodadieno, y la tisasfatona, aislados de *Thysannathus spathulistipus*;⁷⁸ la tinospina A, la 12-*epi*-tinospina A y los tinospinósidos B-C, aislados de *Tinospora saggitata*.⁷⁹ Recientemente se ha demostrado que la salvinorina A es extremadamente potente en este modelo (0.65 pM), además de reducir la expresión de la iNOS en forma dosis dependiente, también disminuye los niveles del factor de necrosis tumoral α (FNT- α) y de interleucina 10 (IL-10).⁸⁰

Otra metodología farmacológica con la que se ha determinado la capacidad antiinflamatoria de los clerodanos es el modelo de edema inducido en oreja de ratón con TPA. En este modelo presentaron actividad antiinflamatoria significativa los ácidos 15,16-epoxi-8 α -(benzoiloxi)metil-2 α -hidroxicleroda-3,13(16),14-trien-18-oico y 15,16-epoxi-2 α -benzoiloxicleroda-3,13(16),14-trien-18-oico. La actividad de estos compuestos es comparable con la betametasona usada como referencia (Figura 24).⁸¹

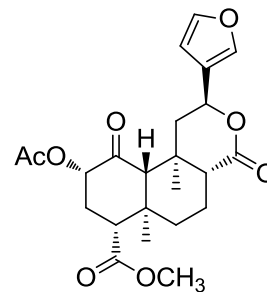
A



3,4:15,16-Diepoxi-13(16),14-clerodadieno: $R_1=R_2=H$
Tisasfatona: $R_1=R_2=O$



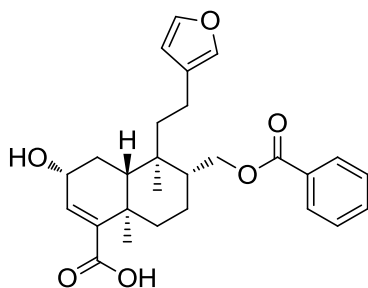
Tinospina A: $R_1=H$, $R_2=H\beta$, $R_3=H\alpha$
12-*epi*-Tinospina A: $R_1=H$, $R_2=R_3=H\beta$
Tinospinósido B: $R_1=Glu$, $R_2=OH\beta$, $R_3=H\alpha$
Tinospinósido C: $R_1=Glu$, $R_2=OH\alpha$, $R_3=H\alpha$



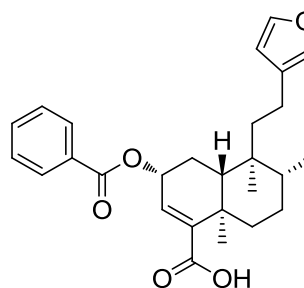
Salvinorina A

Figura 24 A. Clerodanos con actividad antiinflamatoria, A: Inhibidores de la producción de nitritos de la iNOS.

B



Acido 15,16-epoxi-8a-(benzoiloxi)metil-2-hidroxicleroda-3,13(16),14-trien-18-oico



Acido 15,16-epoxi-2a-benzoiloxicleroda-3,13(16),14-trien-18-oico

Figura 24. B: Con actividad en el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón.

2.5.5 Actividad antiprotozoaria

Los protozoarios son organismos eucarióticos unicelulares, varían en forma y tamaño. Estos microorganismos son causantes de enfermedades en el ser humano, que en muchos de los casos requieren un tratamiento complicado por largos periodos de tiempo y muchas veces con efectos adversos.⁸² Algunos de los protozoarios causantes de enfermedades en el ser humano son *Plasmodium* spp. (malaria), *Toxoplasma gondii* (toxoplasmosis), *Trypanosoma* spp. (enfermedad del sueño y enfermedad de Chagas), *Giardia intestinalis* (giardiasis), *Entamoeba histolytica* (disenteria) y *Trichomonas vaginalis* (tricomoniasis).⁸³

Entre los clerodanos con actividad antiprotozoaria (Figura 25) están la linearolactona aislada de *Salvia polystachya* (contra *E. histolytica* y *G. lamblia*).⁸⁴ La casaerlucina A, el caseamembrol A, las laetianólidas A y D, aisladas de *Laetia procerosa*, poseen actividad contra *Leishmania amazonensis*.⁸⁵ La casaerlucina A, el caseamembrol A, las laetianólidas A-D, aisladas de *Laetia procerosa*,⁸⁵ así como las caseargrewiinas A-D, aisladas de *Casearia grewiifolia*,⁸⁶ y el acetato de gomfostenina, aislado de

*Gomphostemma niveum*⁸⁷ poseen actividad contra *Plasmodium falciparum*. La gomfostenina y su respectivo acetato, también tienen actividad antiprotozoaria *in vivo* contra *Plasmodium berghei*.⁸⁸

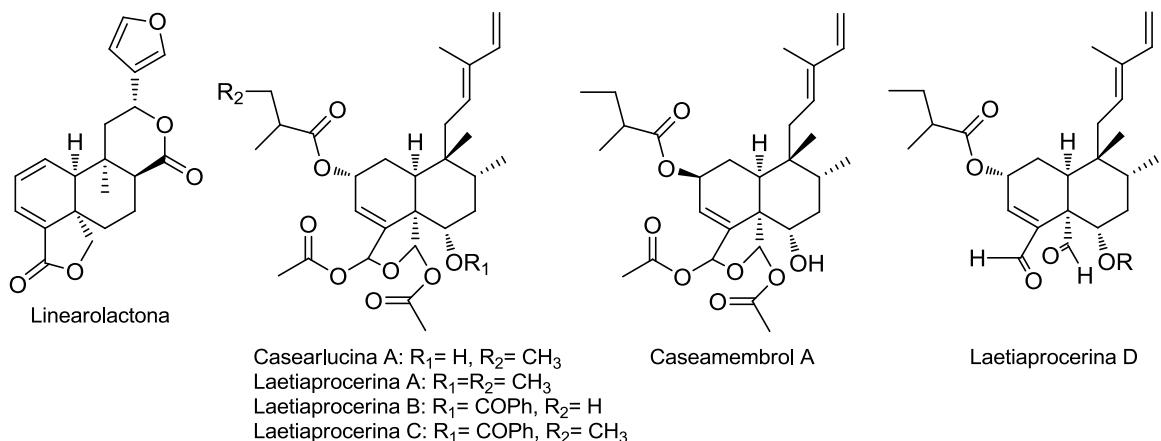


Figura 25. Clerodanos con actividad antiprotozoaria.

Contra *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, se encontró actividad tripanocida de la 19-*nor-trans*-dehidrocrotónina⁸⁹ y un diastereoisómero del esqueleto base de la casearucina A (Figura 26).⁹⁰ Por otra parte, un diastereómero del kolavenol ha presentado actividad significativa contra *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Figura 26).⁹¹

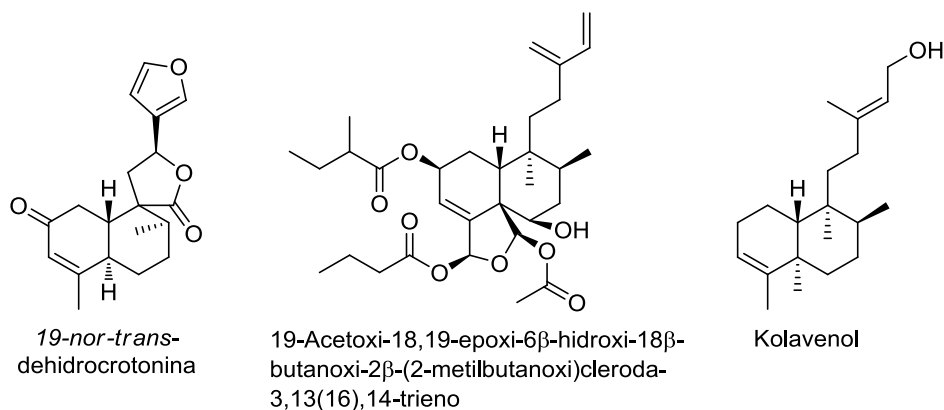


Figura 26. Clerodanos con actividad tripanocida.

2.5.6 Actividad citotóxica

La actividad citotóxica de clerodanos ha sido evaluada contra líneas celulares de carcinoma humano de distintos tipos, destacan los clerodanos aislados de especies del género *Casearia*. Entre los clerodanos citotóxicos están las caseamembrinas A-F, aisladas de *Casearia membranacea*, estos metabolitos

presentaron actividad contra células de cáncer prostático (línea celular PC-3).⁹² Las caseavestrinas A-C, aisladas de *Casearia sylvestris* poseen actividad contra líneas celulares de cáncer bucal (KB), carcinoma pulmonar (LX-1), cáncer de colon (HCT116) y cáncer de ovario (A2780) (Figura 27).⁹³

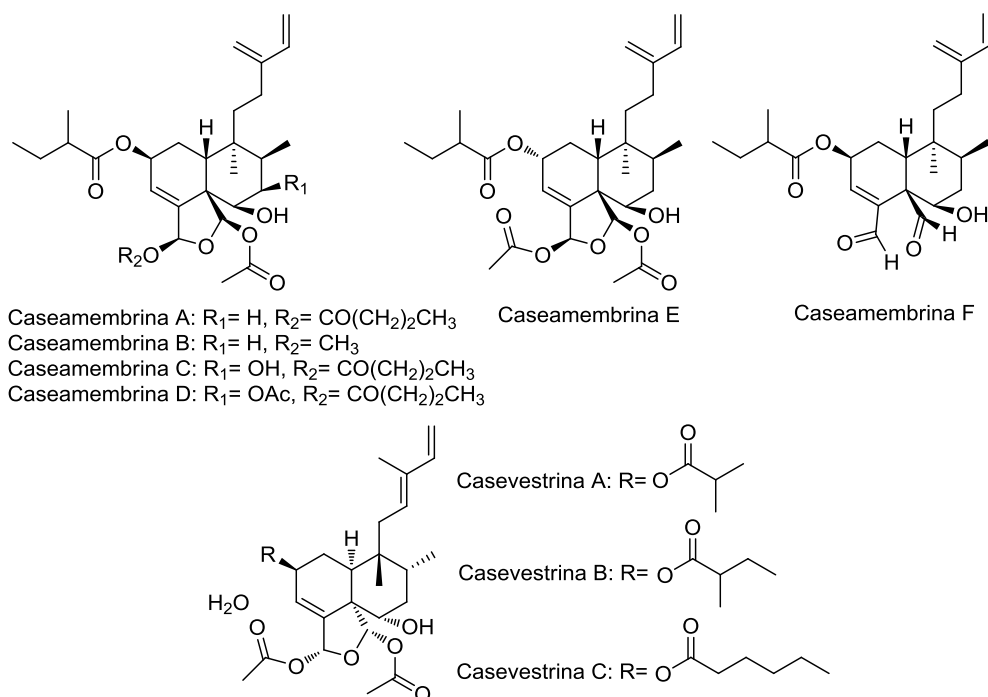


Figura 27. Clerodanos con actividad citotóxica, aislados de *Caesaria membranosa* y *C. sylvestris*.

Otros clerodanos con actividad citotóxica son las caseagrewiinas E-L y la esculentina B, aisladas de *Casearia obliqua* (Figura 28), estos compuestos mostraron actividad contra líneas celulares de carcinoma epidermoide humano de la boca (KB), cáncer de mama (MCF-7) y cáncer pulmonar (NC1-H187).⁹⁴

De *Scutellaria barbata* se aislaron las barbatinas A-C y la scutebarbatina B (Figura 29), estos compuestos presentan actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer bucal (KB), cáncer nasofaríngeo (HONE-1) y cáncer colorectal (HT29).⁹⁵

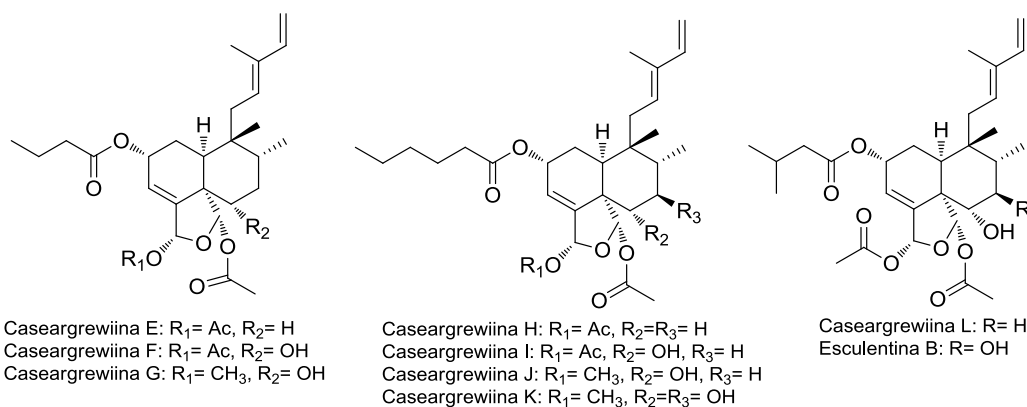


Figura 28. Diterpenos con actividad citotóxica, aislados de *Casearia obliqua*.

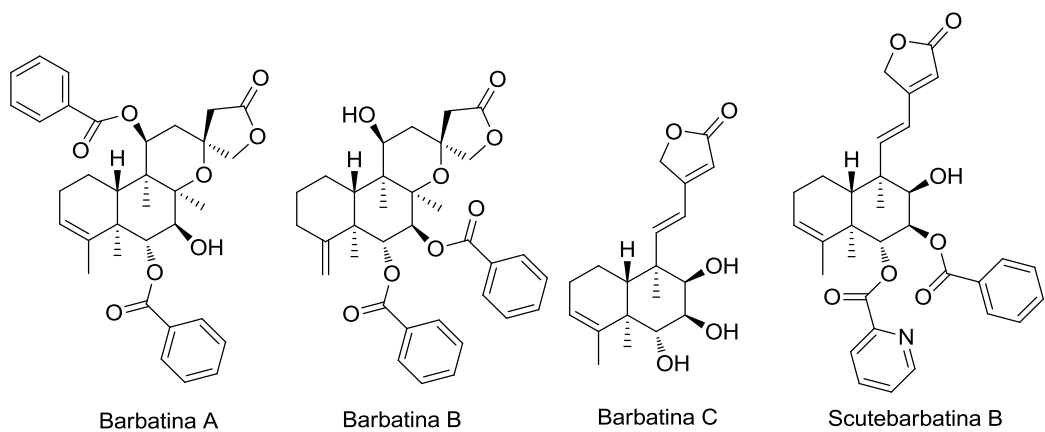


Figura 29. Diterpenos con actividad citotóxica de *Scutellaria barbata*.

Las premonas A-C, se aislaron de *Premna tomentosa* y mostraron actividad contra líneas celulares de carcinoma de pulmón (Lu-1), cáncer de próstata hormona-dependiente (LNCaP) y cáncer de mama (MCF-7). La estructura de estos metabolitos se muestra en la Figura 30.⁹⁶

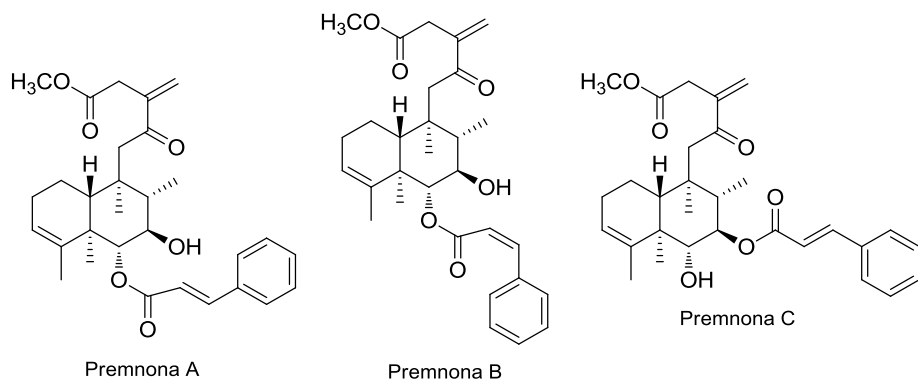


Figura 30. Diterpenos con actividad citotóxica, aislados de *Premna tomentosa*.

3. JUSTIFICACION

Los metabolitos aislados de especies del género *Salvia* poseen una enorme diversidad estructural y una amplia gama de actividades biológicas. De acuerdo a un criterio taxonómico, fueron seleccionadas tres especies de este género para realizar el aislamiento y la caracterización de sus componentes, esto permitirá ampliar el conocimiento de la química del género y de las propiedades biológicas de los metabolitos aislados.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Ampliar el conocimiento de la química del género *Salvia*, subgénero *Calosphace* a través del aislamiento y caracterización de los diterpenos presentes en los extractos de tres especies, estas son: *Salvia herbacea* Benth., *Salvia microphylla* var. Kunth y *Salvia shannoni* J. D. Smith.

Objetivos específicos

Determinar la estructura de los diterpenos aislados de los extractos de las tres especies de *Salvia* mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.

Evaluar las propiedades biológicas de los diterpenos aislados en los modelos: antiinflamatorio (modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón), antiprotozoario (contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*) y citotóxico (contra líneas celulares: U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7 y SKLU-1).

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Métodos de separación

El aislamiento de los metabolitos y productos de reacción reportados en este trabajo se realizó usando cromatografía en columna abierta (CC) de gel de sílice (kieselgel 60G, 90 % < 4.5 μm) o tonsil,⁹⁷ cromatografía en columna rápida de gel de sílice (230-400, Macherey-Nagel). El proceso de monitoreo de fracciones fue hecho por cromatografía en capa fina (CCF) de gel de sílice 60 G UV₂₅₄ (Macherey-Nagel, 20 x 20, 0.25 μm) con observación por exposición a la luz UV (254 nm) y posterior revelado con sulfato cérico 2N y H₂SO₄.

5.2 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas

Los puntos de fusión de los sólidos cristalinos aislados se determinaron en un aparato Fisher-Johns. Los espectros en el infrarrojo (IR) se obtuvieron de un equipo Bruker Tensor 27, los espectros en el UV fueron determinados en un equipo Shimadzu 160U. La rotación óptica de los compuestos fue determinada en un polarímetro Jasco DIP-360. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H, ¹³C y bidimensionales fueron adquiridos en un espectrómetro Varian Unity 500 (500 MHz) o en un equipo Bruker Avance III (400 MHz). Los espectros de masas obtenidos por la técnica de impacto electrónico (EI) fueron adquiridos de un espectrómetro JEOL JMS-AX505HA, los obtenidos por bombardeo de átomos rápidos (FAB⁺) en un equipo Jeol JMS-SX102A y los obtenidos por electrospray (ESI⁺) en un espectrómetro Bruker Daltonics Squire 6000. Los análisis de difracción de rayos-X de monocristal fueron realizados en un difractómetro Bruker Smart Apex CCD con monocromador de grafito y radiación Mo K α .

5.3 Bioensayos de actividad biológica

5.3.1 Actividad antiinflamatoria: Modelo de edema inducido por 13-acetato-12-tetradecanoilforbol (TPA)

Los ratones macho NIH (25-30 g) se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio en jaulas con ciclos de 12/12 horas luz-noche, con acceso libre al alimento y agua. Los ratones se manejaron de acuerdo al protocolo establecido por la NOM-062-ZOO-1999. Posteriormente, se aplicaron en ambas caras de la oreja derecha de un ratón 5 μL /cara de una solución de TPA en etanol (0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 10 minutos después

se aplicaron las sustancias de prueba (10 μL) a diferentes concentraciones (0.031-1.000 $\mu\text{mol/oreja}$). En la oreja izquierda primero se aplicó etanol (10 μL) y después un segundo disolvente (20 μL) como controles. Cuatro horas después, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se removió una biopsia de 7 mm de diámetro de cada oreja. La inhibición del edema se midió como la diferencia en peso entre la biopsia de la oreja derecha y la izquierda. El porcentaje de inhibición del edema (% IE) se calculó de acuerdo a la ecuación: % IE = $100 - [B \times 100/A]$, donde A corresponde al edema inducido por el TPA sólo y B corresponde al edema inducido por el TPA más el compuesto de prueba. Los datos obtenidos se expresaron como el promedio \pm DE (n=6) y los valores de dosis efectiva media (DE₅₀) se determinaron a partir de la ecuaciones de regresión no lineal con los datos significativos.

5.3.2 Actividad antiprotozoaria

Entamoeba histolytica HM-1 IMSS se cultivó a 37 °C en medio TYI-S-33 suplementado con 10 % de suero bovino (inactivado con calor). *Giardia lamblia* IMSS: 8909:1 se cultivó en medio TYI-S-33 modificado, suplementado con 10% de suero de ternera y bilis bovina. Los trofozoitos se mantuvieron en condiciones axénicas, para los ensayos se utilizaron trofozoitos en fase *Log* de crecimiento. Los ensayos de susceptibilidad *in vitro* se llevaron a cabo incubando trofozoitos de *E. histolytica* (6×10^3) o *G. lamblia* (5×10^4) a 37 °C durante 48 hs en presencia de los compuestos puros a evaluar, disueltos en DMSO a diferentes concentraciones (2.5-200 $\mu\text{g/mL}$). Después de la incubación se tomó un inóculo de 50 μL de cada tubo y se transfirió en medio fresco para ser incubado durante 48 hs más en ausencia de compuesto a evaluar. Cada evaluación incluyó metronidazol y emetina como referencias, un control (medio de cultivo, trofozoitos y DMSO) y un blanco (medio de cultivo). El número final de parásitos se midió con un hemocitómetro y el porcentaje de inhibición del crecimiento de los trofozoitos se determinó por comparación con el control. Adicionalmente, los resultados se confirmaron por el método colorimétrico de producción de formazan: lavando y cultivando los trofozoitos durante 45 min a 37 °C en un buffer salino conteniendo bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio y metosulfato de fenazina. El formazan producido durante el ensayo se extrajo y se cuantificó a 570 nm. Cada ensayo se realizó por duplicado y se repitió un mínimo de tres veces. Los datos obtenidos se manejaron por análisis probit y el porcentaje de trofozoitos sobrevivientes se determinó por comparación con el control. Los valores de concentración inhibitoria media (IC₅₀) se obtuvieron de la curva probit versus log de la concentración y posterior análisis de regresión.

5.3.3 Actividad citotóxica

La citotoxicidad de los compuestos evaluados se determinó contra las siguientes líneas celulares de carcinomas humanos: cáncer de colon (HCT-15), cáncer de mama (MCF-7), leucemia (K-562), cáncer de sistema nervioso central (U-251), cáncer de próstata (PC-3) y cáncer pulmonar (SKLU-1). Las diferentes líneas celulares se cultivaron en medio RPMI-1640, suplementado con 10 % de suero fetal de ternera, L-glutamina (2mM), penicilina G (100 UI/L), sulfato de estreptomicina (100 µg/mL) y anfotericina B (0.25 µg/mL). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera oxigénica con 5 % de CO₂. Para los ensayos se colocaron inóculos de 100 µL/pozo (placas de 96 pozos) de cada línea celular (K-562 y MCF-7.5 x 10⁴; U-251 y PC-3: 7.5 x 10⁴; HCT-15: 1 x 10⁵ células/mL) y se incubaron por 24 hs. Posteriormente, se agregaron 100 µL/pozo de compuesto de prueba (0.01-50 µM) y se incubó por 48 hs más. Transcurrido el tiempo de incubación los cultivos adheridos al pozo se fijaron por adición de ácido tricloroacético (50 µL) frío al 50% ^{m/v} e incubando una hora a 4 °C. El sobrenadante fue desechado y las placas se lavaron con agua destilada tres veces. Los cultivos fijados con ácido tricloroacético se teñeron durante 30 min con 100 µL de sulforodamina B al 0.4 %. La proteína teñida se extrajo con una solución de Tris base 10 mM y la densidad óptica se determinó a 510 nm con un lector de microplacas (Elx 808; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA). El porcentaje de inhibición del crecimiento (% IC) se calculó con la siguiente ecuación: % IC = 100 – [B x 100/A], donde A es la densidad óptica de las células (control) y B es la densidad óptica de la células con compuesto de prueba. Adicionalmente, se trazó una curva dosis-respuesta para cada compuesto y la concentración inhibitoria media (IC₅₀) se determinó a partir de las ecuaciones de regresión no lineal usando el software JMP (Versión 3.2.1.; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

5.4 Aislamiento de los metabolitos secundarios

Salvia herbacea Benth.

El material vegetal se recolectó en Agosto de 2009 a la orilla del camino que lleva al poblado de El limón, Municipio de Tehuantepec, Estado de Oaxaca. Las coordenadas de colecta obtenidas con GPS fueron las siguientes: N: 16° 18.879', WO: 95° 26.680', 341 msnm. Un ejemplar del material vegetal colectado se depositó en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM, (MEXU-1 039 699).

La planta se secó a la sombra por dos semanas, una vez seca, las partes aéreas se molieron (4.55 kg) y el material vegetal empacado en una columna se sometió a extracción por percolación con acetona (38 L), para obtener después de la evaporación del disolvente un residuo de 308 g de extracto. Posteriormente el

residuo fue disuelto en metanol (MeOH) caliente (1.7 L) y se agregaron 0.5 L de agua. La mezcla resultante se sometió a partición con hexano (hex) (5 porciones de 1 L).

La fracción hexánica se llevó a sequedad y se obtuvo un residuo de 124.6 g. La fracción hidroalcohólica, se concentró a una quinta parte de su volumen y se sometió nuevamente a partición con acetato de etilo (AcOEt) y agua. Después de evaporar los disolventes se obtuvieron 172.5 g de residuo de la fracción de AcOEt y 8.3 g para la fracción hidroalcohólica.

La fracción de AcOEt (172.5 g) se sometió a cromatografía en columna (CC) de gel de sílice (13 cm h x 10.5 cm di). Se colectaron fracciones (frs) de 500 mL, eluyendo con mezclas: hex/CH₂Cl₂ 1:1 (frs. 1-53), CH₂Cl₂ (frs. 54-62), CH₂Cl₂/acetona 95:5 (frs. 63-83), CH₂Cl₂/acetona 90:10 (frs. 84-96), CH₂Cl₂/acetona 70:30 (frs. 97-110) y acetona (frs. 111-120). Después del análisis por cromatografía en capa fina (CCF) las fracciones de esta columna se reunieron de la siguiente manera: frs-1-6 (fr. A, 0.22 g), frs. 7-35 (fr. B, 53.91 g), frs. 36-64 (fr. C, 29.95 g), frs. 65-84 (fr. D, 26.79 g), frs. 85-100 (fr. E, 21.86 g), frs. 101-113 (fr. F, 17.88 g) y frs. 114-120 (fr. G, 19.3 g).

La fracción B (53.91 g) se sometió a percolación en una columna de tonsil (previamente lavado con AcOEt, dimensiones: 7 cm h x 5.5 cm di) usando hexano (0.15 g), hex/CH₂Cl₂ 1:1 (32.58 g) y AcOEt (10.88 g). De la fracción de hex/CH₂Cl₂ 1:1 se obtuvo el compuesto **1** en forma sólida, este producto se cristalizó de AcOEt/hex y se obtuvieron 3.26 g del producto puro.

Las aguas madres se reunieron con la fracción percolada con AcOEt (10.88 g) por su similitud al ser analizadas en CCF, el disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo (40.20 g) se sometió a CC de gel de sílice (13 cm h x 10.5 cm di, frs. 500 mL). La columna se eluyó con mezclas hex/AcOEt: 85:15 (frs. 1-24), 80:20 (frs. 25-52), 75:25 (53-85), 70:30 (frs. 86-107). Las fracciones obtenidas de esta columna se analizaron en CCF y se reunieron de la siguiente forma: frs. 1-49 (fr. B1, 8.4 g), frs. 50-96 (fr. B2, 16.53 g), frs. 97-107 (fr. B3, 8.90 g).

Los componentes de la fracción B2 se separaron por CC de gel de sílice (12.5 cm h x 8.0 cm di, frs. 250 mL). La columna se eluyó con mezclas hex/acetona: 80:20 (frs. 1-35), 75:25 (frs. 36-48), 65:35 (frs. 49-59), 50:50 (frs. 60-83). De las frs 8-31 de esta columna se obtuvieron por cristalización de acetona/hex 2.92 g del compuesto **1** en forma pura, las aguas madres se reunieron con las frs. 32-59 de la misma columna. El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo de la fr. B2a (5.1 g) se sometió nuevamente a CC de gel de sílice (11.0 cm h x 5.0 cm di, frs. 125 mL), la columna se eluyó con mezclas CHCl₃/AcOEt: 98:2 (frs. 1-25), 95:5 (frs. 26-38), 90:10 (frs. 39-51), 70:30 (frs. 52-60). De las frs. 2-8 de ésta última columna, se obtuvo un sólido cristalino blanco, el sólido se filtró y recristalizó con un sistema CHCl₃/hex. de donde se aislaron 477.6 mg del compuesto **2**. De las frs. 17-33 de la misma columna se obtuvieron por cristalización de acetona/hex. 932.6 mg del compuesto **1**.

La fracción B3 (8.90 g) se sometió a CC de gel de sílice (12 cm h x 7.0 cm di, frs. 250 mL), y la columna fue eluida con: CHCl₃ (frs 1-10), CHCl₃/AcOEt 97.5:2.5 (frs. 13-18), CHCl₃/AcOEt 92.5:7.5 (frs. 19-40), CHCl₃/AcOEt 85:15 (frs. 41-49), CHCl₃/AcOEt 70:30 (frs. 50-55). Después del análisis en CCF de las fracciones obtenidas, se reunieron las fracciones 11-26 (fr.B3a), se evaporó el disolvente y el residuo (5.12 g) se sometió nuevamente a CC flash de gel de sílice con tamaño de malla: 230-400 μm (21.5 cm h x 3.0 cm di, frs. 50 mL), la columna se eluyó con: CHCl₃ (frs. 1-8), CHCl₃/AcOEt 97.5:2.5 (frs. 10-26), CHCl₃/AcOEt 95:5 (frs. 27-82), CHCl₃/AcOEt 92.5:7.5 (frs. 83-100). De esta última columna, se aislaron de las frs. 39-47 por cristalización con acetona/hex., 26.9 mg del compuesto **3**, de las frs. 63-80, 371.1 mg del compuesto **4** y de las frs. 85-92, 363.6 mg del compuesto **5**.

Los componentes de la fracción C (29.95 g) se separaron por CC de gel de sílice (10 cm h x 8.0 cm di, frs. 250 mL). La columna se eluyó con mezclas hex/AcOEt: 80:20 (frs. 1-21), 70:30 (frs. 22-61), 60:40 (frs. 62-84), 30:70 (frs. 85-97). Las frs. obtenidas se analizaron por CCF y se reunieron de la siguiente manera: frs. 25-37 (fr. C1, 5.55 g), frs. 38-91 (fr. C2, 22.6 g).

La fr. C1, se sometió a CC de gel de sílice (9 cm h x 7.0 cm di, frs. 125 mL), la columna se eluyó con mezclas CHCl₃/AcOEt: 97.5:2.5 (1-16), 95:5 (17-45), 92.5:7.5 (frs. 46-56), 90:10 (frs. 57-63), 80:20 (frs.64-69). De las frs. 21-59 de ésta columna se aislaron por cristalización de acetona/hex. 2.26 g del compuesto **1**.

La fr. C2 (22.6 g) se sometió a CC de gel de sílice (10 cm h x 8.0 cm di, frs. 250 mL) y se eluyó de la siguiente manera: hex/AcOEt 80:20 (frs. 1-41), hex/AcOEt 75:25 (frs. 42-81), AcOEt (frs. 82-86). Las frs. obtenidas se analizaron por CCF y se reunieron de la siguiente forma: frs. 23-48 (fr. C2a, 0.81 g), frs. 49-62 (fr. C2b, 2.19 g), frs. 63-85 (fr. C2c, 19.68 g). De la fr. C2a se aislaron por cristalización con un sistema de acetona/hex., 726.3 mg del compuesto **1**. Por su parte, la fr. C2b (2.19 g) se sometió a CC de tonsil (previamente lavado con AcOEt, dimensiones: 12 cm h x 4.0 cm di, frs. 100 mL), la columna se eluyó con mezclas hex/AcOEt: 80:20 (frs. 1-12), 70:30 (frs. 13-44), 60:40 (frs. 45-80). De las frs. 12-55 de ésta columna se aislaron por cristalización con acetona/ hex., 473.7 mg del compuesto **1**. De las frs. 56-73 se aislaron por cristalización de AcOEt/hex., 449.8 mg del compuesto **6**. La fr. C2c (19.68 g) se sometió a CC de tonsil (lavado con AcOEt, dimensiones: 11 cm h x 8.0 cm di, frs. 250 mL), la columna fue eluida con mezclas hex/AcOEt: 75:25 (1-10), 70:30 (11-28), 60:40 (29-40), 30:70 (41-75). Las frs. de ésta columna se analizaron por CCF y se reunieron de la siguiente manera: frs. 23-42 (fr. C2c1, 2.69 g), frs. 43-49 (fr. C2c2, 4.80 g), frs. 50-65 (fr. C2c3, 3.97 g), frs. 66-69 (fr. C2c4, 3.25 g).

La fr. C2c1 se sometió CC de tonsil (lavado con AcOEt, dimensiones: 12.5 cm h x 8.0 cm di, frs. 250 mL), y la columna se eluyó con mezclas hex/AcOEt: 75:25 (frs. 1-20), 70:30 (frs. 21-25), 30:70(26-31). Las frs. obtenidas se reunieron de acuerdo al análisis por CCF de la siguiente forma: frs. 8-14, frs.15-26 y frs.27-29. De las frs. 8-14 de la columna anterior se aislaron por cristalización con acetona/hex. 215.7 mg

del compuesto **1**. Las frs. C2c1-(15-26), se sometieron a CC de gel de sílice (9.0 cm h x 3.5 cm di, frs. 50 mL), la columna se desarrolló con mezclas hex/AcOEt: 75:25 (frs.1-37), 65:35 (38-45). Después de analizar las frs. en CCF; éstas se reunieron de la siguiente forma: frs. 11-18 y 22-31. De las frs. 11-18 de la columna anterior se aislaron por cristalización con acetona/hex. 91.5 mg más del compuesto **1**. Las frs. 22-31 de la misma columna se llevaron a sequedad y el residuo (229.7 mg) se sometió a CC de gel de sílice (8.0 cm h x 2.5 cm di, frs. 25 mL), la columna se eluyó con $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 95:5. De esta columna se obtuvieron 20 frs., de las frs. 6-9 se aislaron por cristalización con acetona/hex. 17.9 mg del compuesto **7**. Las frs. C2c1-(27-29) (1.77 g), se sometieron a CC de gel de sílice (8.5 cm h x 4.5 cm di, frs. 50 mL), la elución de ésta columna se llevó a cabo con mezclas: hex/AcOEt 75:25 (frs. 1-14), 70:30 (frs. 15-47), 60:40 (frs. 48-61). Las frs. de esta columna se analizaron por CCF y se reunieron de la siguiente forma: frs. 22-28 y frs. 29-61. De las frs. 22-28 de la columna anterior se aislaron por cristalización con acetona/hex. 130.2 mg del compuesto **6**. Las frs. C2c1-(27-29)-(29-61) dejaron un residuo de 1.33 g, estas frs. se sometieron nuevamente a CC de gel de sílice (11.0 cm h x 4.0 cm di, frs. 50 mL), la columna se eluyó con mezclas hex/AcOEt: 70:30 (frs. 1-48), 60:40 (frs. 49-56). Después de analizar las frs. por CCF; se reunieron de la siguiente forma: frs. 15-30, frs. 31-56. De las frs. 15-30 de esta última columna se aislaron por sucesivas CC de gel de sílice, eluidas con mezclas hex/AcOEt en polaridad ascendente y por cristalización con AcOEt/hex. 347.5 mg más del compuesto **6**. De las frs. 31-56 de la misma columna se aislaron por sucesivas CC de gel de sílice, eluidas con una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 95:5, 34.9 mg del compuesto **8**.

La fr. C2c2 (4.80 g) se sometió a CC de gel de sílice (9.0 cm h x 6.0 cm di, frs. 100 mL), la columna se eluyó con mezclas hex/AcOEt: 70:30 (frs. 1-23), 65:35 (frs. 24-65), 40:60 (frs. 66-70). Las 70 frs aisladas de esta columna se analizaron por CCF y se reunieron como a continuación se indica: frs. 16-30, frs. 31-40, frs. 41-67. De las frs. 16-30 de la columna anterior se aislaron por cristalización con AcOEt/hex, 60 mg del compuesto **6**. De las frs. C2c2-(31-40) se aisló por sucesivas CC de gel de sílice, eluidas en polaridad ascendente con mezclas $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 95:5 y hex/AcOEt 70:30, así como por cristalización con un sistema de AcOEt/hex. el compuesto **3** (20.7 mg). Por otra parte, de las frs. C2c2-(41-67) se aislaron por sucesivas CC de gel sílice, eluidas con una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 95:5 y por cristalizaciones con AcOEt/hex.; los compuestos **3** (11.0 mg) y **4** (239.3 mg).

Los componentes de la fr. C2c3 (3.97 g) se separaron mediante CC de gel de sílice (9.0 cm h x 4.5 cm di, frs. 50 mL), ésta columna se eluyó con una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 95:5; se obtuvieron 30 frs. de la columna, las frs. 8-15 dejaron un residuo de 606.7 mg. Este residuo se sometió a CC flash (sílica 230-400, 19 cm h x 2.5 cm di, frs. 25 mL) y la columna se eluyó con mezclas hex/AcOEt: 70:30 (frs. 1-8), 60:40 (frs. 9-60). Las fracciones obtenidas se analizaron por CCF y de las frs. 23-54 se aislaron por cristalización con acetona/hexano, 411.1 mg del compuesto **4**.

La fr. C2c4 dejó un residuo de 3.25 g, ésta fr. se sometió a CC de gel de sílice (10.0 cm h x 4.0 cm di, frs. 50 mL), la columna se eluyó con una mezcla CHCl₃/AcOEt 95:5. Las 21 frs. obtenidas se analizaron por CCF y se reunieron de la siguiente manera: frs. 6-9 y frs. 10-11. De las frs. C2c4-(6-9) se aislaron por cristalización con AcOEt/hex., 225.5 mg del compuesto **5**. Las frs. C2c4-(10-11) dejaron un residuo de 497.4 mg que se sometió nuevamente a purificación por CC de gel de sílice empleando una mezcla hex/AcOEt en polaridad ascendente: 70:30 (frs. 1-14), 60:40 (frs. 15-42). De esta columna se aislaron por cristalizaciones con AcOEt/hex. los compuestos **5** (69.4 mg, frs.17-20), **4** (55.9 mg) y **9** (82.2 mg, frs. 27-42).

En la fr. D (26.79 g) cristalizó espontáneamente un sólido de color amarillo, este sólido se removió por filtración y se lavó con AcOEt. El sólido obtenido fue recrystalizado de MeOH y se obtuvieron 1.49 g del compuesto **10**. Los componentes del residuo de la fr. D (24.07 g) se separaron por CC de gel de sílice (10.5 cm h x 6.5 cm di, frs. 250mL), la columna se eluyó con mezclas hex/AcOEt: 70:30 (frs. 1-22), 60:40 (frs.23-50), 40:60 (frs. 51-63), 20:80 (frs. 64-75). Después de analizar las frs. por CCF, se reunieron las frs.: 6-62 (fr. D1, 11.3 g).

La fr. D1 se sometió a CC de tonsil (lavado con AcOEt, dimensiones: 10 cm h x 8.0 cm di, frs. 250 mL), la columna se eluyó con mezclas hex/AcOEt: 70:30 (frs. 1-10), 60:40 (frs. 11-32), 40:60 (frs. 33-45). Las frs. colectadas se analizaron por CCF; y se reunieron las frs. 25-40 (fr. D1c, 2.32 g) para ser sometidas a CC de gel de sílice (7.5 cm h 4.0 cm di, frs. 50 mL), la columna se eluyó con mezclas CHCl₃/AcOEt: 90:10 (frs. 1-16), 80:20 (frs. 17-30), 60:40 (frs.31-40). De las frs. 3-6 de ésta última columna, se aisló mediante sucesivas CC de gel de sílice, eluidas con mezclas hex/AcOEt 70:30 y CHCl₃:AcOEt 95:5, el compuesto **11** (34.5 mg).

Compuesto 1. pf 224-226 °C; IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 3431, 1757, 1718, 1505, 872; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 209 (8539), 266 (7913), 273 (7863); $[\alpha]_D^{22} = -174.0^\circ$ ($c = 0.15$, MeOH); MS-EI⁺ 70 eV m/z (int. rel.): 356 [M]⁺ (16), 328 (28), 311 (16), 253 (15), 218 (36), 160 (100); HRMS-FAB⁺: 357.1335, calculada para C₂₀H₂₁O₆, 357.1338; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 2.

Compuesto 2. pf 192-194 °C; MS-ESI⁺ m/z : 341 [M+H]⁺ y 363 [M+Na]⁺; MS-EI⁺ 70 eV m/z (int. rel.): 340 [M]⁺ (51), 312 (3), 230 (10), 202 (61); RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 2.

Compuesto 3. pf 216-218 °C, MS-EI⁺ 70 eV m/z (int. rel.): 356 (9), 338 (1), 310 (1), 280 (5), 246 (18); RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 2.

Compuesto 4. pf 180-182 °C, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 3409, 1759, 1718, 1505, 873; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 210 (17864); $[\alpha]_D^{22} = -76.0^\circ$ ($c = 0.18$, MeOH); MS-EI⁺ 70 eV m/z (int. rel.): 372 [M]⁺ (0.2), 342 (10), 268 (62), 218 (34); HRMS-FAB⁺: 373.1285, calculada para C₂₀H₂₁O₇, 373.1287; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 3.

Compuesto 5. pf 206-208 °C, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 3519, 1767, 1731, 1512, 871; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 210 (10432); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -93.9^\circ$ ($c = 0.23$, acetona); MS-EI⁺ 70 eV m/z (int. rel.): 372 [M]⁺ (18), 342 (44), 326 (6), 269 (6); HRMS-FAB⁺: 373.1288, calculada para C₂₀H₂₁O₇, 373.1287. RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 3.

Compuesto 6. pf 247-249 °C, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 3428, 1757, 1718, 1504, 875; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 210 (9234); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -30.0^\circ$ ($c = 0.13$, MeOH); MS-EI⁺ 70 eV m/z (int. rel.): 372 [M]⁺ (5), 326 (4), 271 (41), 253 (6), 220 (12); HRMS-FAB⁺: 373.1282, calculada para C₂₀H₂₁O₇, 373.1287; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 2.

Compuesto 7. pf 240-242 °C, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 3437, 1779, 1728, 1504, 875; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 207 (8069); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -56.0^\circ$ ($c = 0.11$, acetona); MS-FAB⁺ m/z (int. rel.): 357 [M+H]⁺ (19), 307 (38), 289 (32), 257 (8); HRMS-FAB⁺ m/z : 357.1313, calculada para C₂₀H₂₁O₆, 357.1338; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 4.

Compuesto 8. Sólido amorfo, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 1750, 1684, 1505, 875; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 212 (12702); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -40.8^\circ$ ($c = 0.24$, acetona); MS-EI⁺ 70 eV m/z (int. rel.): 356 [M]⁺ (6), 328 (100), 246 (17); HRMS-FAB⁺ m/z : 357.1335, calculada para C₂₀H₂₁O₆, 357.1338; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 4.

Compuesto 9. pf 243-245 °C, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 3397, 1772, 1708, 1501, 874; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 210 (11146); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -58.5$ ($c = 0.13$, acetona); MS-FAB⁺ m/z (int. rel.): 357 [M+H]⁺ (3), 289 (11), 281 (3), 239 (2); HRMS-FAB⁺ m/z : 357.1347, calculada para C₂₀H₂₁O₆, 357.1338; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 3.

Compuesto 10. pf 256-258 °C, MS-ESI⁺ m/z : 331 [M+H]⁺, 353 [M+Na]⁺, 369 [M+K]⁺; RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz): δ 12.6 (1H, s, OH-4), 7.54 (1H, dd, $J = 9.0, 2.5$, H-6'), 7.45 (1H, d, $J = 2.5$, H-2'), 7.07 (1H, d, $J = 9.0$, H-5'), 6.87 (1H, s, H-8), 6.75 (1H, s, H-3), 3.91 (3H, s, OCH₃-7), 3.86 (3H, s, OCH₃-4'); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): δ 182.1 (C, C-4), 163.5 (C, C-2), 154.4 (CH, C-3), 151.0 (C, C-4'), 149.6 (C, C-9), 146.8 (C, C-3'), 146.2 (C, C-5), 129.9 (C, C-6), 123.2 (C, C-1'), 118.5 (CH, C-6'), 113.0 (CH, C-2'), 112.1 (CH, C-5'), 105.0 (C, C-10), 103.1 (CH, C-3), 91.5 (CH, C-8), 56.2 (CH₃, OCH₃-7), 55.7 (CH₃, OCH₃-4').

Compuesto 11. Sólido amorfo, IR(película) ν_{\max} (cm⁻¹): 3497, 1754, 1505, 875; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 212 (3.36), 265 (2.53); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -50.0$ ($c = 0.21$, MeOH); MS-EI⁺ m/z (int. rel.): 372 [M]⁺ (14), 344 (28), 326 (24), 260 (16), 234 (36); HRMS-FAB⁺ m/z : 373.1281, calculada para C₂₀H₂₁O₇, 373.1287; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 4.

Bromación de 5. A una solución de **5** (35.4 mg en 10 mL de CH₂Cl₂) a 0 °C bajo atmósfera inerte, se adicionaron por goteo 0.2 mL de una solución de bromo (0.2 mL de bromo en 5 mL de CH₂Cl₂). La mezcla de reacción resultante se agitó durante 1 h a 0 °C y posteriormente se agitó 1 h más a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo de reacción se agregó NaHCO₃ y se agitó durante 5 min., la mezcla se

filtró y el disolvente se evaporó. El residuo de la reacción se sometió a CC de sílice, usando como eluyente una mezcla CHCl₃/AcOEt 90:10, de donde se obtuvieron 8.5 mg del compuesto **12** y se cristalizó con AcOEt/hexano (pf 230-232 °C). HRMS-FAB⁺ *m/z* 451.0398, calculada para C₂₀H₂₀O₇Br. RMN ¹H (CDCl₃) δ 7.48 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-15), 6.50 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-14), 6.41 (1H, m, H-3), 5.65 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-19_{pro-R}), 5.16 (1H, dd, *J* = 10.5, 7.5 Hz, H-12), 4.68 (1H, m, H-7), 4.13 (1H, br s), 3.93 (1H, dd, *J* = 7.5, 2.5 Hz, H-19_{pro-S}), 3.52 (1H, br s, H-1), 3.10 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-8), 2.95 (1H, ddd, *J* = 21.0, 3.0, 1.5 Hz, H-2a), 2.74 (1H, ddd, *J* = 21.0, 4.0, 2.5 Hz, H-2b), 2.42 (1H, dd, *J* = 14.0, 2.5 Hz, H-6α), 2.08 (1H, dd, *J* = 13.5, 7.5 Hz, H-11β), 2.00 (1H, ddd, *J* = 14.0, 3.5, 2.0 Hz, H-6β), 1.43 (1H, dd, *J* = 13.5, 10.5 Hz, H-11α), 1.42 (3H, s, H-20); RMN ¹³C (CDCl₃) δ 174.1 (C, C-17), 168.7 (C, C-18), 145.3, (CH, C-15), 134.2 (C, C-4), 127.7 (CH,C-3), 122.5 (C, C-13), 121.6 (C, C-16), 111.0 (CH, C-14), 73.3, (CH₂, C-19), 71.3 (CH, C-12), 66.3 CH, C-7), 63.9 (C, C-10), 57.6 (CH, C-1), 48.4 (CH, C-8), 43.1 (C, C-5), 39.8 (C, C-9), 37.3 (CH₂, C-11), 34.3 (CH₂, C-6), 27.5 (CH₂, C-2), 23.7 (CH₃, C-20).

Acetilación de 11. A una solución de **11** (17.4 mg en 0.2 mL de piridina) se adicionaron 0.2 mL de anhídrido acético, la mezcla resultante se dejó en agitación a 50 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de reacción, se adicionaron 3 mL de agua, la mezcla resultante fue colocada en un embudo de separación y extraída con AcOEt (3 x 5 mL). La fase orgánica fue extraída con una solución de HCl al 5% (3 x 5 mL) y finalmente con una solución saturada de NaHCO₃ (3 x 5 mL). El disolvente se evaporó a presión reducida y el residuo se sometió a CC de sílice, empleando como sistema de elución una mezcla hexano/AcOEt 60:40 para obtener como polvo amorfo 4.5 mg del compuesto **13**. HRMS-FAB⁺ *m/z* 415.1394, calculada para C₂₂H₂₃O₈, 415.1393; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 4.

Salvia shannoni J. D. Smith

El material vegetal se recolectó en el cerro Sepultura (en el km 8 de la carretera Arriaga-Tuxtla Gutierrez), municipio de Arriaga, estado de Chiapas. Las coordenadas de su ubicación son: 16° 16.401' Norte, 93° 52.281' Oeste, a 126 msnm. Un ejemplar del material vegetal colectado se depositó en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM, (MEXU- 1 320 389).

Las hojas secas y molidas (1.35 kg) se sometieron a extracción por percolación con hexano (8 L, 32.24 g) y acetona (12 L, 164.95 g). El residuo del extracto de acetona se disolvió en hexano (1.8 L) y se sometió a partición con una mezcla metanol/agua 80:20 (1 L x 5). La fracción hidroalcohólica se concentró a una quinta parte de su volumen y se sometió nuevamente a partición con AcOEt (1L x 3).

El residuo de la fracción de AcOEt (106 g) fue suspendido en celita y se percoló en una columna del mismo material con hexano, hexano/AcOEt 95:5 hexano/AcOEt 90:10 y AcOEt. La fracción de AcOEt dejó un residuo de 48.0 g y se percoló en una columna de tonsil con CH₂Cl₂, después de la percolación se obtuvo un sólido cristalino, mismo que fue filtrado y purificado por recristalización con una mezcla

acetona/hexano para obtener 3.98 g del compuesto **14**. Las aguas madres dejaron un residuo de 42.0 g y se sometieron a CC de gel de sílice (9.5 cm h x 8.0 cm di, frs. 500 mL), usando como eluyentes, mezclas hexano/AcOEt 80:20 (frs. 1-5), hexano/AcOEt 75:25 (frs. 6-24), hexano/AcOEt 70:30 (frs. 25-60), hexano/AcOEt 60:40 (frs. 61-74) y acetona (frs. 75-80). Después de analizar cada una de las fracciones por CCF se reunieron de la siguiente manera: frs. 16-26 (fr. A, 5.43 g), 27-34 (fr. B, 7.35 g), 35-52 (fr. C, 13.0 g), 53-66 (fr. D 5.44 g), 67-73 (fr. E, 1.24 g).

En la fr A cristalizó un sólido blanco, mismo que fue purificado por recristalización con acetona/hexano para obtener 1.95 g del compuesto **14**. Las aguas madres de esta fracción se purificaron por CC de gel de sílice (9.0 cm h x 4.5 cm di, frs. 50 mL), la columna se eluyó con una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 9:1 y se obtuvieron 23 frs., después del análisis de CCF, las fracciones se reunieron de la siguiente manera: frs. 1-8 (fr. A1, 0.87 g), frs. 9-12 (fr. A2, 0.43 g), frs. 13-23 (fr. A3, 0.60 g). Los componentes de la fr. A1 se separaron por CC de gel de sílice (7.5 cm h, 2.5 cm di, frs. 25 mL), se utilizó una mezcla de elución de hexano/AcOEt 70:30 y se obtuvieron 12 fracciones. De las frs. 4-8, se obtuvieron a través de sucesivas CC eluidas con una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 95:5, 21.3 mg del compuesto **15**. La fracción A2 también se sometió a CC de gel de sílice (8.5 cm h, 2.5 cm di, frs. 25 mL) y se eluyó con una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 92.5:7.5 para obtener 22 fracciones. De las frs. 11-12 mediante cristalización con acetona/hexano se obtuvieron 30.3 mg del compuesto **16**. De la fr. A3 se aislaron por cristalización con acetona/hexano, 549.3 mg del compuesto **14**.

De la fr. B se aislaron por cristalización con acetona/hexano, 612.1 mg del compuesto **14**, el residuo (6.74 g) se sometió a CC de gel de sílice (9.0 cm h x 5.5 cm di, 125 mL) usando como mezcla de elución $\text{CHCl}_3/\text{acetona}$ 97.5:2.5 (frs. 1-26), $\text{CHCl}_3/\text{acetona}$ 95:5 (frs. 27-42), $\text{CHCl}_3/\text{acetona}$ 90:10 (frs. 43-55). Las fracciones obtenidas de la columna anterior se analizaron por CCF y se reunieron de la siguiente manera: frs. 9-13 (fr. B1, 589.1 mg), frs. 14-25 (fr. B2, 901.4 mg), frs. 26-35 (fr. B3, 1.47 g), frs. 36-44 (fr. B4, 536.6 mg), frs. 45-55 (fr. B5, 320.0 mg). De la fracción B1 se aislaron por sucesivas CC eluidas con $\text{CHCl}_3/\text{acetona}$ 97.5:2.5, 16.6 mg de **15**. De la fracción B2 se obtuvieron 163.8 mg de **16** mediante sucesivas CC eluidas con $\text{CHCl}_3/\text{acetona}$ 95:5. De la fr. B3 se obtuvieron por cristalización con acetona/hexano, 1.02 g de **14**. En la fr. B5 cristalizó un sólido incoloro, este sólido se purificó por cristalización con acetona/hexano para obtener 292.3 mg de **17**.

Los componentes de la fr. C se separaron por CC de gel de sílice (9.0 cm h x 7.0 cm di, frs. 250 mL) usando como fase móvil una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{acetona}$ 95:5 para obtener 29 fracciones, analizadas por CCF y reunidas de la siguiente manera: frs. 2-4 (fr. C1, 4.63 g), frs. 5-6 (fr. C2, 1.25 g), frs. 7-8 (fr. C3, 0.755 g), frs. 9-12 (fr. C4, 0.734 g), frs. 13-15 (fr. C5, 1.87 g), frs. 16-23 (fr. C6, 0.600 g), frs. 24-29 (fr. C7, 0.546 g). De la fracción C1 se obtuvieron por sucesivas CC de gel de sílice eluidas con mezclas hexano/AcOEt 70:30, 316 mg del compuesto **14**. La fr. C2 se sometió a CC (9.5 cm h x 3.0 cm di, frs. 25

mL) y se eluyó con una mezcla hexano/AcOEt 70:30. De las frs. 7-11 de la columna anterior se aislaron por cristalización con acetona/hexano, 211.4 mg de **14**. De las frs. 23-36 de la misma columna se aislaron por cristalización con acetona/hexano, 22.3 mg de **18**. De la fr. C3 también se aislaron 68.7 mg de **18** utilizando el sistema de cristalización de acetona/hexano. Por otra parte, de la fr. C4 se aislaron por CC de gel de sílice, eluida con una mezcla hexano/CHCl₃/MeOH 50:45:5 y posterior cristalización con acetona/hexano, 166.4 mg de **19**. De la fr. C5 se aislaron por cristalización directa 435.8 mg de **19**. La fr. C6 mostró en CCF una mezcla de los productos **17** y **19**, la mezcla se separó por sucesivas CC eluidas con hexano/CHCl₃/MeOH 50:45:5 para obtener por cristalización con acetona/hexano, 296.2 mg de **17** y 53.5 mg de **19**. Los componentes de la fr. C7 se separaron por CC de gel de sílice, eluida con una mezcla hexano/CHCl₃/MeOH 50:45:5. De esta columna se obtuvieron a través de cristalización con AcOEt/acetona/hexano, 98.5 mg de **17** y 28.1 mg de **20**, respectivamente.

La fr. E se sometió a CC (5.0 cm h x 3.5 cm di, frs. 25 mL) usando una mezcla hexano/CHCl₃/MeOH 50:40:10. Las fracciones 2-6 de esta columna dejaron un residuo de 0.44 g y se reunió con la fr. D, para obtener un residuo final de 5.88 g, mismo que se sometió a CC (8.5 cm h x 5.5 di, frs. 100 mL), eluida con una mezcla CHCl₃/acetona 95:5 (frs 1-30) y CHCl₃/acetona 90:10 (frs. 31-41). Las fracciones se analizaron por CCF y se reunieron de la siguiente forma: frs. 5-8 (fr. D1, 0.600 g), frs. 9-10 (fr. D2, 0.323 g), frs. 11-12 (fr. D3, 0.332 g), frs. 13-23 (fr. D4, 1.452 g), frs. 24-34 (fr. D5, 0.487 g), frs. 36-41 (fr. D6, 0.143 g).

De la fr. D1 se obtuvieron 22 fracciones mediante CC de sílice (8.0 cm h x 3.0 cm di, frs. 25 mL), eluida con una mezcla CHCl₃/AcOEt 90:10. De las frs. 10-12 de la misma columna se aislaron por cristalización con AcOEt/hexano, 42.8 mg del compuesto **4**.

En la fr. D3 cristalizó un sólido, éste se filtró y se lavó con acetona para obtener 43.1 mg del compuesto **18**, posteriormente se evaporó el disolvente de las aguas madres y el residuo se sometió a CC de sílice (8.5 cm h x 3.0 cm di, frs. 25 mL) empleando una mezcla CH₂Cl₂/MeOH 98:2 para obtener 10 frs. Después de un análisis minucioso por CCF se reunieron las frs. 5-7. Estas frs. dejaron un residuo de 300 mg y se sometieron a CC de tonsil (9.5 cm h x 3.0 cm di, frs. 25 ml), empleando CH₂Cl₂/MeOH 98:2 como eluyente, de las frs. 8-9 se aisló por cristalización con AcOEt/hexano el compuesto **21** (97.6 mg).

Los componentes de la fr. D4 se separaron mediante sucesivas CC de sílice, usando como sistema de elución una mezcla CH₂Cl₂/MeOH 98:2 y posteriormente por cristalización con AcOEt/hexano, se obtuvieron 651 mg del compuesto **19**.

La fr. D6 se sometió a CC de sílice (7.5 cm h x 3.0 cm di, frs. 25 mL) y se eluyó con una mezcla CH₂Cl₂/MeOH 98:2. De las frs. 6-7 se obtuvieron por cristalización con acetona/hexano, 23.5 mg del compuesto **22**.

Compuesto 14. pf 254-256 °C, MS-EI⁺ 70 eV *m/z* (int. rel.): 359 [M+H]⁺ (24), 341 (3), 313 (16), 220 (100); RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 5.

Compuesto 15. pf 252-254 °C, IR(pastilla) ν_{\max} : 3470, 1761, 1735, 1609, 877; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 213 (4915); $[\alpha]_D^{22} = +52.4^\circ$ ($c = 0.17$, acetona); MS-EI⁺ 70 eV *m/z* (int. rel.): 374 [M]⁺ (54), 346 (14), 328 (4), 168 (14) HRMS-FAB⁺: 375.1445, calculada para C₂₀H₂₃O₇, 375.1444; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 7.

Compuesto 16. pf 261-263 °C, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 3409, 3321, 1757, 1718, 1630, 874; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 209 (6940); $[\alpha]_D^{22} = -4.5^\circ$ ($c = 0.20$, acetona); MS-EI⁺ 70 eV *m/z* (int. rel.): 358 [M]⁺ (4), 330 (87), 312 (9), 220 (100); HRMS-FAB⁺: 358.1414, calculada para C₂₀H₂₂O₆, 358.1416; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 6.

Compuesto 17. 282-284 °C, MS-FAB⁺ *m/z* (int. rel.): 390 [M]⁺ (2), 372 (6), 362 (8), 345 (8), 276 (14); RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 6.

Compuesto 18. pf 294-296 °C, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 3387, 1756, 1729, 1629, 875; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 209 (5644); $[\alpha]_D^{22} = +116.4^\circ$ ($c = 0.22$, DMSO); MS-EI⁺ 70 eV *m/z* (int. rel.): 358 [M]⁺ (40), 340 (3), 312 (2), 160 (18); HRMS-FAB⁺: 358.1408, calculada para C₂₀H₂₂O₆, 358.1416; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 6.

Compuesto 19. pf 254-256 °C, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 3493, 3305, 1769, 1723, 875; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 208 (6639); $[\alpha]_D^{22} = +49.56^\circ$ ($c = 0.23$, MeOH); MS-EI⁺ 70 eV *m/z* (int. rel.): 374 [M]⁺ (2), 356 (15), 344 (22), 260 (34); HRMS-FAB⁺: 374.1369, calculada para C₂₀H₂₂O₇, 374.1366; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 6.

Compuesto 20. pf 204-206 °C, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 3501, 3412, 1745, 1704, 876; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 208 (1571); $[\alpha]_D^{22} = -129.4^\circ$ ($c = 0.17$, acetona); MS-EI⁺ 70 eV *m/z* (int. rel.): 374 [M]⁺ (82), 356 (7), 346 (2), 328 (16); HRMS-FAB⁺: 374.1368, calculada para C₂₀H₂₂O₇, 374.1366; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 5.

Compuesto 21. pf 192-194 °C, MS-EI⁺ 70 eV *m/z* (int. rel.): 358 [M]⁺ (48), 340 (88), 253 (32), 230 (28), 202 (100); RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 5.

Compuesto 22. pf 226-228 °C, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 3392, 3344, 1728, 876; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 210 (11266); $[\alpha]_D^{22} = -3.85^\circ$ ($c = 0.13$, acetona); MS-EI⁺ 70 eV *m/z* (int. rel.): 388 [M]⁺ (1), 368 (2), 350 (1), 341 (8), 308 (5); RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 7.

Salvia microphylla Kunth.

Las partes aéreas de la planta se recolectaron en Septiembre de 2011 a la orilla de la carretera federal México-Cuernavaca, a la altura del poblado de Topilejo. Los datos de su ubicación obtenidos con GPS son los siguientes: 19° 11.902' N, 99° 9.948' O, 2784 msnm. Un ejemplar del material vegetal

recolectado se depositó en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM, (MEXU-1 319 659).

Las hojas y flores secas se molieron para obtener una cantidad de 370 g, posteriormente se sometieron a extracción por percolación con hexano (2 L, 16 g) y acetona (4 L, 12.3 g).

El extracto seco de acetona se sometió a CC de gel de sílice (10.0 cm h x 6.0 cm di, frs. 500 mL) usando como eluyentes CHCl_3 (frs. 1-3), $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 70:30 (frs. 4-6) y $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 30:70 (frs. 7-9). Después de un análisis minucioso por CCF se reunieron las frs. obtenidas de la siguiente manera: frs. 1-2 (fr. A, 1.1 g), fr. 3 (fr. B, 1.14 g), fr. 4 (fr. C, 1.72 g), fr. 5 (fr. D, 0.98 g) y frs. 6-9 (fr. E, 3.1 g).

Los componentes de la fr. A se separaron por CC de gel de sílice (6.5 cm h x 3.0 cm di, frs. 25 mL) usando mezclas de hexano/AcOEt 60:40 (frs. 1-16) y hexano/AcOEt 40:60 (frs. 16-24). De las frs. 7-16 de ésta columna se obtuvieron 54.3 mg del compuesto **23** y de las frs. 17-22 se aislaron por cristalización con AcOEt/hexano, 59.1 mg del compuesto **24**.

La fr. B se sometió a CC de gel de sílice (6.0 cm h x 3.0 cm di, frs. 25 mL) empleando como fase móvil, mezclas $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 97:3 (frs. 1-21), $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 95:5 (frs. 22-31) y $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$ 85:15 (frs. 32-35). Las fracciones de esta columna se analizaron por CCF y se reunieron de la siguiente manera: frs. 8-22 (fr. B1, 270.0 mg) y frs. 23-31 (fr. B2, 45.5 mg).

La fr. B1 se purificó por CC de gel de sílice (6.0 cm h x 2.0 cm di, frs. 25 mL) utilizando como sistema de elución una mezcla hexano/ $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 50:48:2 para obtener 8 fracciones. De la fracción 3 de ésta columna se aislaron por cristalización con AcOEt/hexano, 24.3 mg del compuesto **23**.

La fr. B2 se purificó por CC de gel de sílice (6.0 cm h x 2.0 cm di, frs. 10 mL) usando como eluyente una mezcla hexano/AcOEt 70:30. Las 20 fracciones colectadas de esta columna se analizaron por CCF y se reunieron las frs. 11-14, obteniendo después de la evaporación del disolvente, 3.5 mg del compuesto **25**.

De la fr. C se obtuvo un sólido cristalino, éste se removió por filtración y se recristalizó con $\text{CHCl}_3/\text{DMSO}$, obteniendo 190 mg del compuesto **26**. Las aguas madres de **26** dejaron un residuo de 322.8 mg, mismo que se sometió a CC de sílice (9.0 cm h x 2.5 cm di, frs. 25 mL) utilizando como fase móvil una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 99.5:0.5. De esta columna se colectaron 10 fracciones y de la fracción 6 se obtuvieron por cristalización con AcOEt/hexano, 133.4 mg del compuesto **24**. De las frs. 7-8 de la misma columna se aislaron por cristalización con AcOEt 71.7 mg de **26**.

Finalmente, la fracción D se purificó empleando CC de sílice (7.0 cm h x 3.0 cm di, frs. 25 mL) y se eluyó con una mezcla de hexano/AcOEt 60:40 (frs. 1-24). De las frs. 17-22 de ésta columna se obtuvieron por cristalización con AcOEt/hexano 23.7 mg del compuesto **27**.

Compuesto 23. Sólido amorfo, IR(pastilla) ν_{max} (cm^{-1}): 1750, 1708, 874; UV λ_{max} (MeOH) nm (ϵ): 212 (21318); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -294^\circ$ ($c = 0.15$, acetona); MS-EI⁺ m/z (int. rel.): 340 [M]⁺ (2), 329 (0.6), 295 (1.6), 246 (6); RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 8.

Compuesto 24. pf 213-215 °C, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 1751, 1696, 874; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 210 (23210); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -255^{\circ}$ ($c = 0.24$, acetona); MS-EI⁺ m/z (int. rel.): 356 [M]⁺ (34), 338 (11), 310 (8), 246 (20); HRMS-FAB⁺ m/z : 357.1328, calculada para C₂₀H₂₁O₆, 357.1338; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 8.

Compuesto 25. Polvo amorfo, UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 207 (4384), 302 (9326); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 106^{\circ}$ ($c = 0.17$, CHCl₃); MS-ESI⁺ m/z 363 [M+Na]⁺, HRMS-FAB⁺ m/z : 341.1388, calculada para C₂₀H₂₁O₆, 341.1389; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 9.

Compuesto 26. pf 253-255°C, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 3495, 1737, 1694; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 210 (24453); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -334^{\circ}$ ($c = 0.15$, acetona); MS-EI⁺ m/z (int. rel.): 356 [M]⁺ (10), 338 (37), 328 (8), 293 (30); HRMS-FAB⁺ m/z : 357.1331, calculada para C₂₀H₂₁O₆, 357.1338; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 8.

Compuesto 27. pf 230-232 °C, IR(pastilla) ν_{\max} (cm⁻¹): 3356, 1731, 1671; UV λ_{\max} (MeOH) nm (ϵ): 211 (6477), 295 (8801); $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = 177^{\circ}$ ($c = 0.18$, acetona); MS-EI⁺ m/z (int. rel.): 356 [M]⁺ (80), 338 (8), 310 (8), 282 (6), 262 (10); HRMS-FAB⁺ m/z : 357.1348, calculada para C₂₀H₂₁O₆, 357.1338; RMN ¹H y ¹³C: ver Tabla 9.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Estudio químico de *Salvia herbacea* Benth.

A partir del extracto de las partes aéreas de *Salvia herbacea*, se aislaron 10 diterpenos con esqueleto carbonado de *neo*-clerodano y una flavona (Figura 31). Ocho de los diterpenos aislados presentaron estructuras que no habían sido descritas, a estos *neo*-clerodanos se les dió el nombre de tehaninas A-H (7, 8, 11, 1, 4, 5, 6 y 9), en consideración al sitio de recolección del material vegetal. Las estructuras de los dos diterpenos restantes se identificaron como la 1(10)-dehidrosalviarina (2) y la 1 β ,10 β -epoxisalviarina (3).⁴⁷

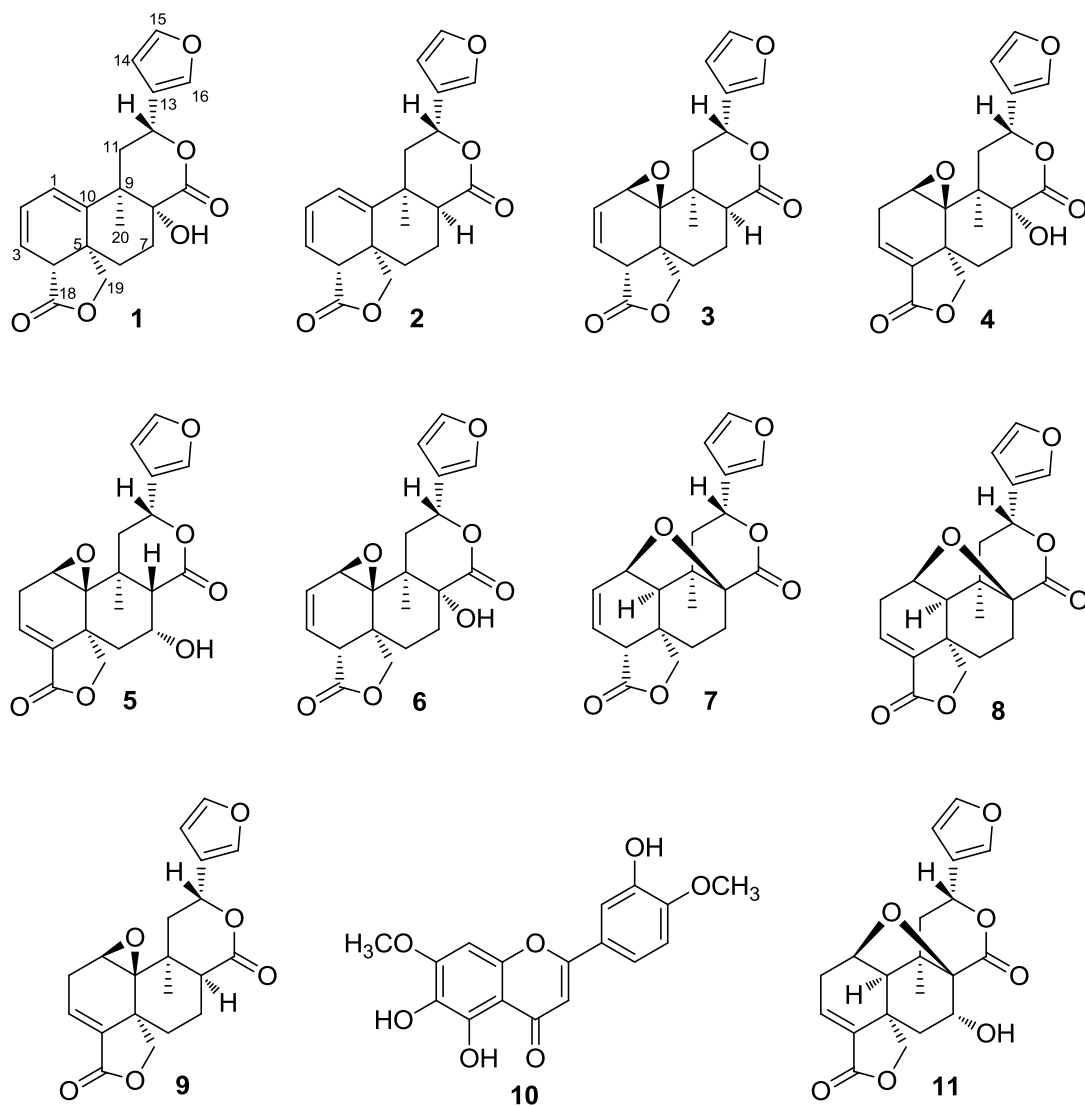


Figura 31. Metabolitos aislados del extracto de acetona de *S. herbacea*.

El compuesto **2** se aisló como un sólido blanco cristalino (477.6 mg, 0.011 %), su estructura se determinó por la comparación de los datos de RMN ^1H y ^{13}C de **2**, con los reportados para la 1(10)-dehidrosalviarina, aislada de *Salvia lineata*.⁴⁷

El compuesto **1** se aisló como un sólido cristalino de color blanco (10.8 g, 0.24 %). Su espectro en el IR mostró bandas de absorción a 3432, 1757, 1719 y 873 cm^{-1} , indicativas para un grupo hidroxilo, una γ -lactona, una δ -lactona y un furano. Su fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$ (11 grados de insaturación) se determinó del espectro de HRMS-FAB⁺. El espectro de RMN ^1H (Tabla 2) mostró señales características para un clerodano con un anillo de furano a δ 7.50 (1H, m, H-16), 7.43 (1H, td, $J = 1.5, 0.5$ Hz; H-15) y 6.47 (1H, ddd, $J = 2.0, 1.0, 0.5$ Hz; H-14) y una 18,19 γ -lactona con señales a δ 4.48 (1H, d, $J = 8.5$ Hz; H-19_{Pro-S}) y 4.01 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz; H-19_{Pro-R}).⁴ En el espectro COSY (Figura 32), se observó un sistema de señales a δ 6.11 (1H, d, $J = 6.0$ Hz), 6.19 (1H, ddd, $J = 9.5, 6.0, 3.0$ Hz), 5.63 (1H, ddd, $J = 9.5, 3.0, 0.5$ Hz) y 3.08 (1H, t, $J = 3.0$ Hz) que correlacionaron entre sí; este conjunto de señales se asignó a los protones H-1, H-2, H-3 y H-4, respectivamente. Adicionalmente, a δ 5.54 se observó un dd ($J = 12.5, 3.5$ Hz) que correlaciona con dos señales a δ 2.65 (1H, dd, $J = 15.5, 12.5$ Hz) y 2.24 (dd, $J = 15.5, 3.5$ Hz). Estas últimas señales son características de una 12,17 δ -lactona⁴ y se asignaron a los protones H-12, H-11 α y H-11 β , respectivamente. En el espectro de RMN ^{13}C (Tabla 2) se observó una señal para carbono base de oxígeno a δ 75.0 (C) que presentó correlación en el espectro HMBC (Figura 32) con dos señales ubicadas a δ 2.47 (1H, dt, $J = 13.5, 3.5$ Hz, H-7 β) y 2.03 (1H, td, $J = 13.5, 3.5$ Hz, H-7 α), a su vez estas dos señales mostraron interacción con el carbonilo en C-17 (δ 172.5, C). Lo anterior determinó la presencia de un grupo hidroxilo en C-8. La determinación de la estructura de **2** ayudó a establecer la orientación del hidroxilo en C-8 del compuesto **1**, debido al desplazamiento observado a campo alto para los carbonos C-11 (δ_{C} 34.4, CH_2) y C-20 (δ_{C} 26.1, CH_3) en **1**, con respecto a las mismas señales de **2** (δ 40.7, C-11; δ 32.1, C-20), que es explicado por el efecto gama-Gauche del OH-8 y que requiere una orientación α .

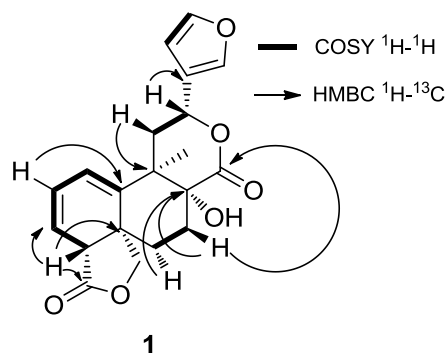


Figura 32. Correlaciones homo y heteronucleares observadas para el compuesto **1**.

La estereoquímica relativa del compuesto **1** se determinó por las correlaciones observadas en el espectro NOESY (Figura 33) de H-4 β con H-6 β (1H, dddd, $J = 14.5, 14.5, 3.5, 2.0$ Hz) y de H-19_{Pro-R} con H-6 α , que indica una γ -lactona *cis*-fusionada. Las interacciones de H-7 α con H₃-20 y H-19_{Pro-R} indicaron una orientación α -axial de H₃-20. La orientación del anillo de furano se determinó por el valor de las constantes de acoplamiento ($J_{11\alpha-12} = 12.5$ y $J_{11\beta-12} = 3.5$ Hz), que indican que el proton H-12 posee una orientación β -axial y por tanto al anillo de furano posee una orientación α -ecuatorial. De acuerdo a lo discutido anteriormente, la estructura del compuesto **1** se determinó como la mostrada en la Figura 32 y se le dió el nombre de tehuanaína D.

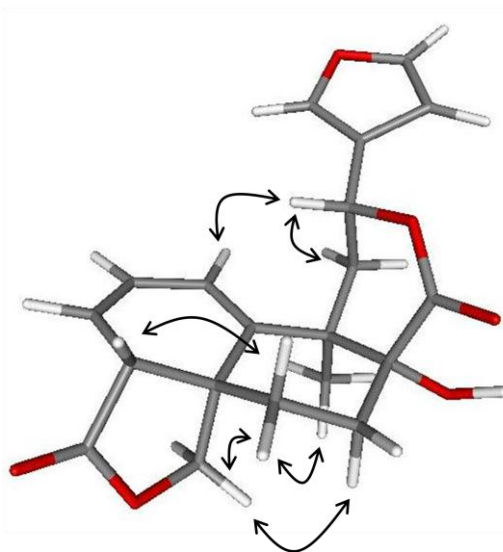


Figura 33. Correlaciones NOESY observadas para el compuesto **1**.

El compuesto **3** se aisló como sólido cristalino (58.6 mg, 0.0013 %), presentó un ión molecular $[M]^+$ a m/z 356 en su espectro de masas obtenido por IE^+ y un ión pseudomolecular $[M+H]^+$ a m/z 357 en el espectro obtenido por ESI^+ , consistente con una fórmula $C_{20}H_{20}O_6$. El espectro de RMN 1H (Tabla 2) de **3** difiere de **2** por la presencia de una señal desplazada a campo alto a δ 3.55 (1H, dd, $J = 4.5, 2.0$ Hz) asignada a H-1 (δ_c 49.0, CH). Lo anterior sugirió la presencia de un epóxido 1,10 en el compuesto **3**. Su estructura se determinó por comparación con los datos espectroscópicos reportados en la literatura para la 1 α ,10 α -epoxisalviarina (Figura 31).⁴⁷

Por otra parte, el compuesto **6** (tehuanaína E) también se aisló como un sólido cristalino (1.07 g, 0.024 %), este difiere de **3**, debido a que mostró un ión pseudomolecular $[M+H]^+$ a 373.1282 en su espectro de masas obtenido por $HRMS-FAB^+$, consistente con una fórmula molecular $C_{20}H_{20}O_7$. En sus espectros de RMN 1H y ^{13}C (Tabla 2) también se observaron señales para un grupo 1,10-epoxi (δ_H 3.63, dd, $J = 4.5, 1.5$

Hz, H-1; δ_C 48.9, CH, C-1; δ_C 67.6, C, C-10). El compuesto **6** difiere de **3** por la diferencia en el δ de C-8 en **6** (δ_C 73.2, C) con respecto a **3** (δ_C 45.4, CH). Al igual que en el espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **1**, se observó un desplazamiento a campo alto de la señal para C-11 (δ_C 34.7, CH_2) en el espectro de **6** con respecto al espectro de **3** (δ_C 38.1, CH_2 , C-11), debido al efecto gama-gauche generado por un grupo hidroxilo con orientación α en C-8 para el compuesto **6**. Adicionalmente, las correlaciones observadas en el espectro HMBC de H-7 β ($\delta = 2.65$, dt, $J = 13.5, 4.5$ Hz) y H-7 α ($\delta = 1.95$, ddd, $J = 13.5, 12.0, 4.5$ Hz) con C-8 confirman la presencia del grupo hidroxilo en esta posición.

La estereoquímica relativa del compuesto **6** se determinó por las correlaciones observadas en el espectro NOESY y resultó ser la misma que la del compuesto **1** en cuanto a la orientación de la 18,19 γ -lactona, la 12,17 δ -lactona, del metilo (C-20) y el anillo de furano. El espectro NOESY no fue concluyente para determinar la orientación del epóxido 1,10; debido a que al estudiar las posibles interacciones en modelos moleculares, se observó que H-1 puede presentar interacciones con H-11 α , H-11 β y H-12, independientemente de la orientación del epoxido, por lo que fue necesario determinar su orientación por difracción de rayos-X de monocristal.

En el diagrama ORTEP (Figura 34) obtenido para la tehuana E (**6**) se observa una orientación β del grupo epóxido. Por su parte, los valores de desplazamiento de RMN de ^1H y ^{13}C , así como la rotación óptica de **3** ($[\alpha]_D^{20} = -93.7$) fueron idénticos con los descritos para la 1 α ,10 α -epoxisalviarina ($[\alpha]_D^{20} = -90.3$),⁴⁷ por lo que la estructura de este último compuesto se corrigió a 1 β ,10 β -epoxisalviarina (Figura 31).

Tabla 2. Desplazamientos químicos en RMN ¹H (500 MHz) y ¹³C (125 MHz) para los compuestos **1-3** y **6**, determinados en CDCl₃.

Posición	1		2		3 ^a		6 ^a	
	δ _H (mult, <i>J</i> en Hz)	δ _C	δ _H (mult, <i>J</i> en Hz)	δ _C	δ _H (mult, <i>J</i> en Hz)	δ _C	δ _H (mult, <i>J</i> en Hz)	δ _C
1	6.11 d (6.0)	120.7, CH	6.03 d (6.0)	119.6, CH	3.59 dd (4.5, 2.0)	49.0, CH	3.63 dd (4.5, 1.5)	48.9, CH
2	6.19 ddd (9.5, 6.0, 3.0)	124.6, CH	6.15 ddd (9.5, 6.0, 3.0)	124.6, CH	6.28 ddd (9.5, 4.5, 3.0)	125.7, CH	6.29 ddd (9.5, 4.5, 3.0)	125.6, CH
3	5.63 ddd (9.5, 3.0, 0.5)	119.1, CH	5.61 dd (9.5, 3.0)	119.3, CH	5.66 dt (9.5, 2.0) ^b	125.7, CH	5.66 dt (9.5, 1.5) ^b	125.3, CH
4	3.08 t (3.0)	51.5, CH	3.08 t (3.0)	51.6, CH	2.87 ta (3.0)	50.7, CH	2.85 t a (3.0)	51.0, CH
5		42.1, C		42.4, C		43.3, C		42.9, C
6α	1.94 dt (14.5, 3.5)	32.0, CH ₂	1.83 d a (14.0)	32.0, CH ₂	1.86 m	29.3, CH ₂	2.03 dt (14.0, 4.5)	30.0, CH ₂
6β	1.35 dddd (14.5, 14.5, 3.5, 2.0)		1.39 dddd (14.0, 14.0, 3.5, 2.5)		1.79 m ^b		1.75 m ^b	
7α	2.03 td (13.5, 3.5)	28.0, CH ₂	2.07 tt (14.5, 4.0)	19.1, CH ₂	2.03 m	18.0 CH ₂	1.95 ddd (13.5, 12.0, 4.5)	27.2, CH ₂
7β	2.47 dt (13.5, 3.5)		2.52 m		2.62 m ^b		2.65 dt (13.5, 4.5)	
8		75.0, C	2.55 m	48.4, CH	2.60 m ^b	45.4, CH		73.2, C
9		42.1, C		37.6, C		36.9, C		41.4, C
10		139.4, C		139.4		66.7, C		67.6, C
11α	2.65 dd (15.5, 12.5)	34.5, CH ₂	1.97 dd (15.5, 2.5)	40.8, CH ₂	1.74 dd (15.0, 10.0)	38.1, CH ₂	2.26 dd (15.0, 12.0)	34.7, CH ₂
11β	2.24 dd (15.5, 3.5)		2.59 dd (15.0, 3.0)		2.16 dd (15.0, 5.0) ^b		1.77 dd (15.0, 4.5) ^b	
12	5.54 dd (12.5, 3.5)	71.3, CH	5.52 dd (12.5, 3.0)	70.7, CH	5.76 dd (10.0, 5.0) ^b	71.4, CH	5.63 dd (10.0, 5.0) ^b	71.2, CH
13		124.6, C		124.6, C		125.1, C		125.8, C
14	6.47 ddd (2.0, 1.0, 0.5)	108.5, CH	6.44 dd (2.0, 1.0)	108.4, CH	6.39 s a	107.6, CH	6.48 dd (2.0, 1.0)	108.1, CH
15	7.43 td (1.5, 0.5)	143.8, CH	7.44 t (2.0)	143.8, CH	7.42 m	143.1, CH	7.40 t (2.0)	143.0, CH
16	7.50 m	139.9, CH	7.49 m	139.7, CH	7.43 m	138.7, CH	7.46 m	139.3, CH
17		177.0, C		171.3, C		170.7, C		171.8, C
18		172.5, C		177.2, C		174.3, C		174.6, C
19 <i>pro R</i>	4.48 d (8.5)	75.8, CH ₂	4.49 d (8.5)	75.8, CH ₂	4.47 d (9.0)	70.2, CH ₂	4.50 d (8.5)	71.6, CH ₂
19 <i>pro S</i>	4.01 dd (8.5, 2.0)		4.01 dd (8.5, 2.0)		4.15 dd (9.0, 1.5)		4.16 dd (8.5, 2.0)	
20	1.21 s	26.1, CH ₃	1.25 s	32.2, CH ₃	1.22 s	25.3, CH ₃	1.11 s	20.0, CH ₃

^a Determinado en CDCl₃ + DMSO-*d*₆
^b Señales sobrepuestas

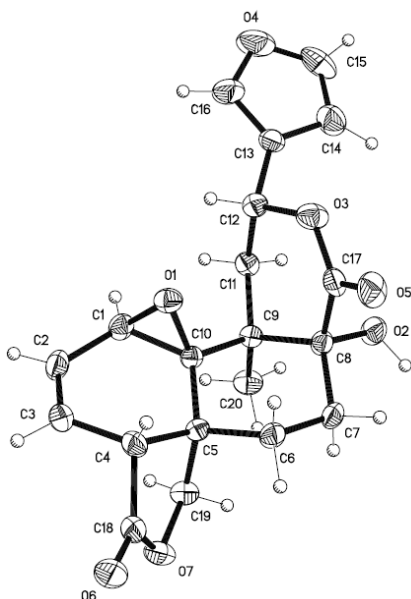


Figura 34. Diagrama ORTEP del compuesto **6**.

El compuesto **4** se aisló como sólido cristalino (1.09 g, 0.024 %), en su espectro de masas obtenido por HRMS-FAB⁺, se observó un ión pseudomolecular [M+H]⁺ a m/z 373.1285, consistente con una fórmula C₂₀H₂₀O₇. En el espectro de RMN ¹³C (Tabla 3) se observaron 20 señales, en el espectro DEPT estas correspondieron a un metilo, cinco metilenos (cuatro alifáticos y uno base de oxígeno), seis metinos (tres aromáticos, un vinílico y dos base de oxígeno) y ocho carbonos cuaternarios, de los cuales dos corresponden a carbonilo de lactona. El espectro de RMN ¹H de **4** (Tabla 3) es diferente al de **6** por la presencia de una señal a δ 6.38 (1H, ddd, $J = 4.0, 3.0, 1.0$ Hz) asignada a H-3 (δ_C 126.2, CH) y por la presencia de dos señales a δ 2.96 (1H, ddd, $J = 21.0, 3.0, 1.0$ Hz) y δ 2.76 (1H, ddd, $J = 21.0, 4.0, 2.5$ Hz) asignadas a los protones H-2a y H-2b (δ_C 27.3, CH₂). Lo anterior sugirió la presencia de un epóxido 1,10 y una doble ligadura en C-3 del esqueleto de clerodano, esto se confirmó por los acoplamientos observados en el espectro COSY (Figura 35) y por las correlaciones heteronucleares ¹H-¹³C de C-3 (δ_C 126.2, CH) con H-1 (δ_H 3.46, s a), H-2a y H2b, así también, por las correlaciones de C-4 (δ_C 134.0, C) con H-6 β (1.94, m) y de C-10 (δ_C 63.9, C) con H-2a (Figura 35). Adicionalmente, en el espectro de RMN ¹H (Tabla 3) se observaron señales características de un anillo de furano (δ_H 7.49, m, H-16; 7.43, t, $J = 2.0$ Hz, H-15; 6.41, dd, $J = 2.0, 1.0$ Hz, H-14), una γ -lactona (δ_H 5.32, d, $J = 7.5$ Hz, H-19_{Pro-R}; 4.02, dd, $J = 7.5, 2.0$ Hz, H-19_{Pro-S}) y una δ -lactona (δ_H 5.74, dd, $J = 11.5, 2.0$ Hz, H-12; 1.90, dd, $J = 15.0, 2.0$ Hz, H-11 β ; 1.60, dd, $J = 15.0, 11.5$ Hz, H-11 α). Debido a las interacciones observadas en el espectro NOESY, la estereoquímica de **4** es igual a la previamente establecida para el compuesto **6**. Por su parte, al compuesto **4** se le dió el nombre de tehanina G.

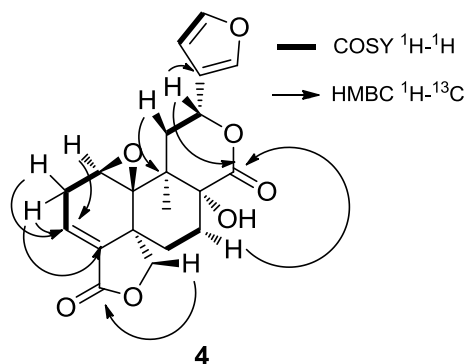


Figura 35. Correlaciones homo y heteronucleares observadas para el compuesto **4**.

El compuesto **5** (658.5 mg, 0.015 %) por su parte, presentó la misma fórmula molecular que **4**, deducida de su espectro por HRMS-FAB⁺. En el espectro de RMN de ¹H de **5** (Tabla 3), se observaron las mismas señales para el anillo A, el anillo de furano; así como las γ y δ -lactonas que se observaron en el espectro de **4**. El compuesto **5** difiere de **4** en dos señales en el espectro de RMN de ¹H, una de ellas geminal a un grupo hidroxilo a δ 4.67 (1H, dt a, $J = 3.5, 2.0$ Hz) y la otra señal a δ 3.07 (1H, d, $J = 3.5$ Hz), característica de un protón alfa a un carbonilo; estas señales se asignaron a H-7 (δ_C 66.0, CH) y H-8 (δ_C 48.1, CH) respectivamente, esto es indicativo de un grupo hidroxilo en C-7 y se confirmó a través de las correlaciones COSY observadas de H-7 con H-8, H-6 α y H-6 β (Figura 36). El espectro HMBC, también respaldó la presencia de un hidroxilo en C-7, por las correlaciones heteronucleares observadas de H-8 con C-7 y C-17 (δ_C 174.2, C). El compuesto **5** fue nombrado tehuana F.

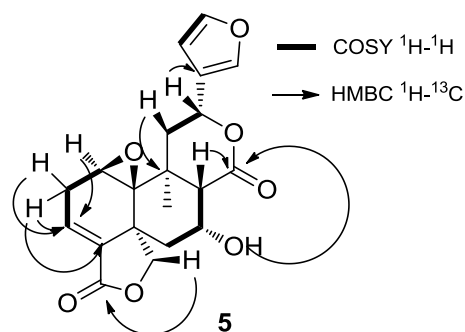


Figura 36. Correlaciones homo y heteronucleares observadas para el compuesto **5**.

Las correlaciones observadas en el espectro NOESY (Figura 37) de **5**, permitieron definir su estereoquímica. La presencia de una correlación entre H-19_{Pro-R} (1H, 5.65, d, $J = 7.0$ Hz) y H₃-20 (3H, 1.24, s) indicó una orientación α del metileno 19. El valor de las constantes de acoplamiento entre los

protones del metileno en C-11 y H-12 ($J_{11\alpha-12} = 10.5$ y $J_{11\beta-12} = 7.0$ Hz) son indicativas de que el furano tiene orientación α -ecuatorial.

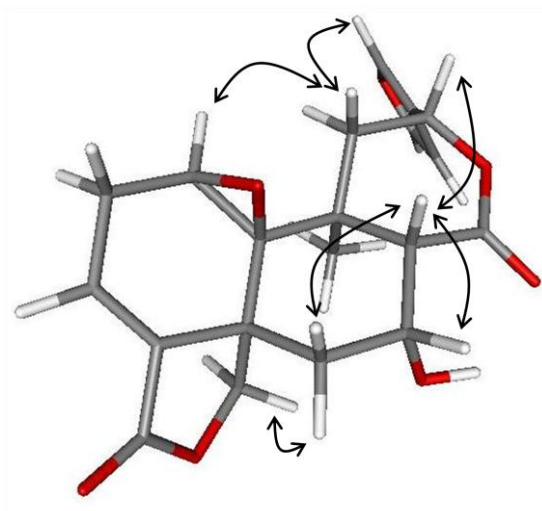


Figura 37. Correlaciones NOE observadas para el compuesto **5**.

Adicionalmente, se observó una interacción NOE 1,4 entre H-12 y H-8, por tanto H-8 tiene una orientación β -axial, esto sólo es posible si la δ -lactona tiene una conformación de bote. Las correlaciones observadas de H-8 con H-7 y H-6 β determinaron la orientación del grupo hidroxilo en C-7 como α ; el valor de la constante de acoplamiento entre los dos protones H-8 y H-7 ($J_{ax-ec} = 3.5$ Hz) apoyó esta suposición. La configuración absoluta de la tehuana F (**5**) se determinó por cristalografía de rayos-X de monocristal a partir del derivado monobromado **12** (Figura 38). Este derivado se preparó al hacer reaccionar **5** con una solución de bromo en las condiciones descritas en la parte experimental, el diagrama ORTEP obtenido para **12** se muestra en la Figura 39, su estructura correspondió a la de un *neo*-clerodano.

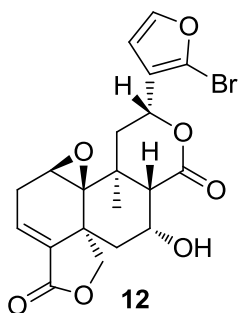


Figura 38. Estructura de la 16-bromotehuana F **12**.

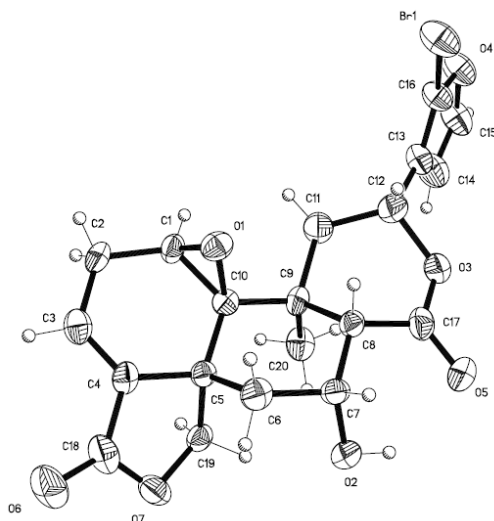


Figura 39. Diagrama ORTEP del compuesto **12**.

El compuesto **9** (tehuana H) se aisló con un rendimiento del 0.0012 % (55.9 mg). En su espectro de masas de HRMS-FAB⁺ se observó un ión pseudomolecular [M+H]⁺ a m/z 357.1347, congruente con la fórmula molecular C₂₀H₂₀O₆. Este compuesto difiere de **4** y **5** en 16 unidades de masa menos, lo que indica que **9** un metileno en C-7 (δ_C 20.2, CH₂) y un metino en C-8 (δ_C 46.9, CH). Esto es sustentado por las correlaciones COSY observadas entre H-8 (δ_H 2.63, m, 1H) y H-7's (δ_H 2.60, m; 2.03, m), y las de H7a con H-6's (2.03, m; 1.94, m). Las correlaciones observadas en el espectro HMBC también apoyaron esta estructura, dada la presencia de acoplamientos de H-8 con C-17 (δ_C 172.2, C) y C-10 (δ_C 64.9).

El compuesto **7**, se aisló (17.9 mg) por cristalización con una mezcla de acetona/hexano. En su espectro en el IR se observaron bandas para un furano monosustituido, γ y δ -lactonas. En el espectro de RMN ¹³C (Tabla 4) se observaron 20 señales en congruencia con su fórmula molecular C₂₀H₂₀O₆, determinada por HRMS-FAB⁺ que muestra un ión pseudomolecular [M+H]⁺ a m/z 357.1330. En su espectro de RMN ¹H (Tabla 4) se observaron dos señales de protones vinílicos a δ 6.26 (1H, ddd, J = 10.0, 5.0, 2.0 Hz) y 6.10 (1H, dd, J = 10.0, 6.0 Hz), estas dos señales presentaron correlación entre sí en el espectro COSY y se asignaron a los protones H-2 (δ_C 126.6, CH) y H-3 (δ_C 122.9, CH) (Figura 40). Adicionalmente, ambas señales mostraron correlación con la señal a δ 3.00 (1H, dd, J = 6.0, 2.0 Hz), asignada a H-4 (δ_C 49.2, CH); por su parte, la señal de H-2 tuvo correlación con otra señal con desplazamiento de hidrógeno geminal a un oxígeno a δ 4.49 (1H, t, J = 5.0 Hz) que se asignó a H-1 (δ_C 71.6, CH). A su vez esta última señal también se correlaciona con la señal a δ 2.06 (1H, d, J = 5.0 Hz) que se asignó a H-10 (δ_C 46.6, CH). Lo anterior estableció un arreglo diferente de puente etéreo entre C-1 y algún otro átomo de carbono en la molécula. La otra posición de unión del puente etéreo se estableció en C-8 (δ_C 82.4, C) como lo

indica el valor de desplazamiento de esta señal. Lo anterior se confirmó al someter el compuesto **7** a condiciones de acetilación y recuperar el producto de partida. Una vez determina la estructura de **7** se le dió el nombre de tehuanaína A.

Tabla 3. Desplazamientos químicos en RMN ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) para los compuestos **4-5** y **9**, determinados en CDCl_3 .

Posición	4		5		9 ^a	
	δ_{H} (mult, <i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, <i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, <i>J</i> en Hz)	δ_{C}
1	3.46 s a	53.4, CH	3.55 s a	57.4, CH	3.62 s a	55.4, CH
2a	2.96 ddd (21.0, 3.0, 1.0)	27.3, CH ₂	2.95 ddd (21.0, 3.0, 1.5)	27.2, CH ₂	2.96 ddd (21.2, 3.2, 1.2)	27.2, CH ₂
2b	2.76 ddd (21.0, 4.0, 2.5)		2.75 ddd (21.0, 4.0, 2.5)		2.76 ddd (21.2, 4.0, 2.4)	
3	6.38 ddd (4.0, 3.0, 1.0)	126.2, CH	6.41 m ^b	127.7, CH	6.43 m	128.1, CH
4		134.0, C		133.8, C		132.7, C
5		41.1, C		42.7, C		43.2, C
6 α	2.34 dt (13.5, 8.5)	26.3, CH ₂	2.41 dd (14.0, 2.0)	33.9, CH ₂	2.03 m ^b	27.2, CH ₂
6 β	1.97 m ^b		1.98 ddd (14.0, 3.5, 2.0)		1.94 m ^b	
7 α	1.94 m ^b	30.9, CH ₂		66.0, CH	2.03 mb	20.2, CH ₂
7 β	2.52 dt (14.0, 9.0)		4.67 dt a (3.5, 2.0)		2.60 m ^b	
8		74.6, C	3.07 d (3.5)	48.1, CH	2.63 m ^b	46.9, CH
9		41.8, C		39.5, C		38.2, C
10		63.9, C		63.7, C		64.9, C
11 α	1.60 dd (15.0, 11.5)	40.2, CH ₂	1.47 dd (13.5, 10.5)	37.5, CH ₂	1.68 dd (14.8, 11.2)	39.3, CH ₂
11 β	1.90 dd (15.0, 2.0)		2.14 dd (13.5, 7.0)		2.11 dd (14.8, 3.6)	
12	5.74 dd (11.5, 2.0)	72.9, CH	5.26 dd (10.5, 7.0)	71.2, CH	5.57 dd (11.2, 3.6)	71.9, CH
13		123.9, C		123.8, C		125.1, C
14	6.41 dd (2.0, 1.0)	108.1, CH	6.42 dd (2.0, 1.0) ^b	108.4, CH	6.40 dd (1.6, 0.8)	108.2, CH
15	7.43 t (2.0)	143.9, CH	7.45 t (2.0)	144.1, CH	7.42 t (1.6)	143.8, CH
16	7.49 m	140.0, CH	7.47 m	139.8, CH	7.44 m	139.5, CH
17		176.4, C		174.2, C		172.2, C
18		168.8, C		168.7, C		168.1, C
19 <i>pro R</i>	5.32 d (7.5)	75.1, CH ₂	5.65 d (7.0)	73.1, CH ₂	4.58 d (8.0)	72.5, CH ₂
19 <i>pro S</i>	4.02 dd (7.5, 2.0)		3.93 dd (7.0, 2.0)		4.06 dd (8.0, 1.6)	
20	1.07 s	22.7, CH ₃	1.40 s	23.4, CH ₃	1.20 s	26.0, CH ₃

^a Determinado a 400 MHz

^b Señales sobrepuestas

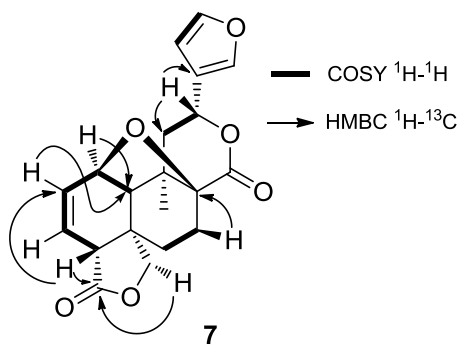


Figura 40. Principales correlaciones homo y heteronucleares observadas para **7**.

En el espectro NOESY de **7** se observó la presencia de señales cruzadas de H-12 β con H-1 α , esta interacción es independiente de la orientación del sustituyente oxigenado en C-1. También se observaron señales cruzadas de H-19_{pro-S} con H-10 y con H₃-20 que indicaron una fusión *cis* de los anillo A y B del esqueleto de clerodano; las correlaciones de H-19_{pro-R} con H-6 α y con H-4 β indicaron una 18,19- γ -lactona con fusión *cis*. La estereoquímica de la tehanina A (**7**), determinada por las correlaciones observadas en el espectro NOESY (Figura 41) es consistente con la obtenida por difracción de rayos-X (Figura 42).

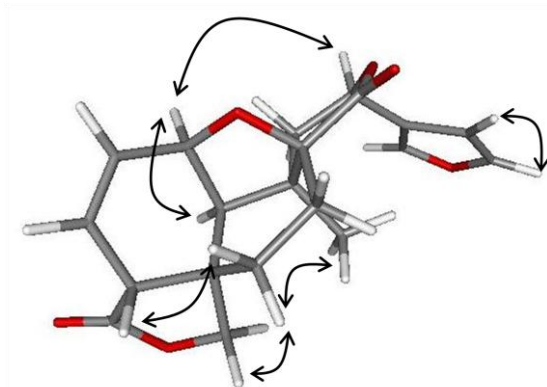


Figura 41. Principales correlaciones NOE observadas para el compuesto **7**.

En el espectro HMBC (Figura 40) no se observa la interacción de C-8 con H-1 a través del puente. La funcionalidad 1,8-epoxi es poco común en diterpenos con esqueleto carbonado de clerodano y no ha sido descrita previamente en la literatura, por lo que fue necesario comprobarla a través de un estudio de difracción de rayos-X de monocristal (Figura 42).

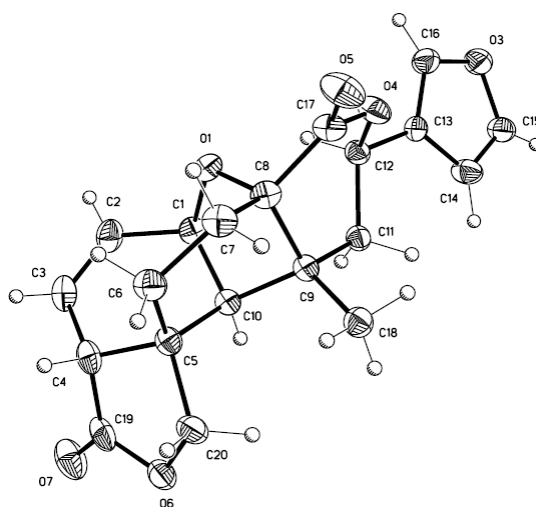


Figura 42. Proyección ORTEP de la tehanina A (**7**).

El compuesto **8** tuvo la misma fórmula molecular que **7** ($C_{20}H_{20}O_6$) determinada por HRMS-FAB⁺. En su espectro de RMN ¹H (Tabla 4) observamos dos diferencias con respecto al espectro de **7**. La primera de ellas, una sola señal para protón vinílico con δ a 6.88 (1H, dd, $J = 6.0, 2.5$ Hz) que fue asignada a H-3 (δ_C 134.0, CH) y la segunda, dos señales a δ 3.08 (1H, ddd, $J = 21.0, 8.0, 6.0$ Hz) y 2.78 (1H, ddd, $J = 21.0, 2.5, 1.0$ Hz), que corresponden a protones de un metileno, ausentes en el espectro de **7**, estas señales se asignaron a los protones H-2a y H-2b (δ_C 31.0, CH₂). Esta secuencia se confirmó por las correlaciones homonucleares observadas en el espectro COSY (Figura 43). Lo anterior sugirió que **8** es isómero de **7** y que en su estructura tiene una doble ligadura conjugada con la γ -lactona. Las correlaciones presentes en el espectro HMBC de C-18 (δ_C 168.2, C) con H-3 y con H-19_{Pro-R} (1H, 4.50, d, 9.5) confirmaron esta suposición, por tanto, la estructura de **8** se estableció como la que se muestra en la Figura 31.

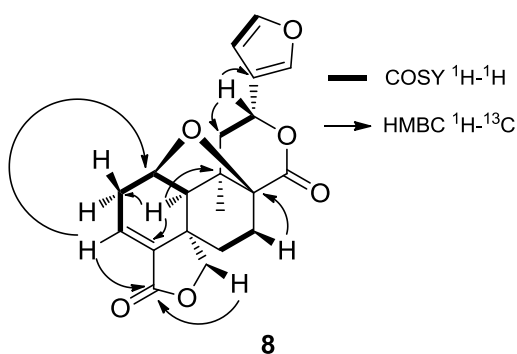


Figura 43. Principales correlaciones homo y heteronucleares observadas para **8**.

El compuesto **11** se aisló como polvo amorfo, en su espectro de HRMS-FAB⁺ se observó un ión pseudomolecular $[M+H]^+$ a m/z 373.1281, congruente con la fórmula $C_{20}H_{20}O_7$. El espectro de RMN ¹H de **11** (Tabla 4) mostró una señal a δ 4.42 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz) que lo hizo diferir del compuesto **8**, esta señal es característica de un protón base de alcohol y se asignó a H-7. El compuesto **11** se acetiló con un exceso de anhídrido acético en piridina para obtener al compuesto acetilado **13** (Figura 44). En el espectro de RMN ¹H de **13** se observó sólo una señal para metilo de acetato (δ_H 2.05, s, 3H) y en el espectro de RMN ¹³C se observaron señales que correspondieron a dos carbonos de un grupo acetato (δ_C 168.0, C; 21.0, CH₃). La posición de dicho grupo, se definió a partir del cambio en el desplazamiento a campo bajo de la señal de C-7 (δ_C 69.1, CH). Esto hizo suponer que **11** posee en su estructura un puente etéreo 1,8 y un grupo hidroxilo en C-7. Las correlaciones observadas en el espectro COSY entre H-7 y H-6 β (δ_H 2.03 dd, $J = 16.0, 4.0$ Hz), así como las señales cruzadas en el espectro HMBC de H-7 con C-5 (δ_C 40.2, C), C-8 (δ_C 81.3, C) y C-9 (δ_C 45.0, C); confirmaron la presencia de un grupo hidroxilo en C-7.

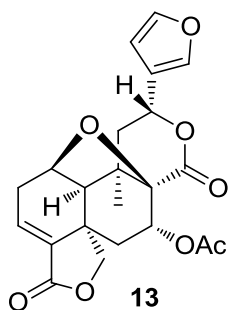


Figura 44. Estructura del compuesto **13**.

El flavonoide **10** aislado de las fracciones polares tuvo una fórmula molecular $C_{17}H_{14}O_7$, determinada por espectrometría de masas. La estructura de este compuesto se determinó por comparación con los datos espectroscópicos de la 7,4'-dimetoxi-5,6,3'-trihidroxiflavona (Figura 45).⁹⁸

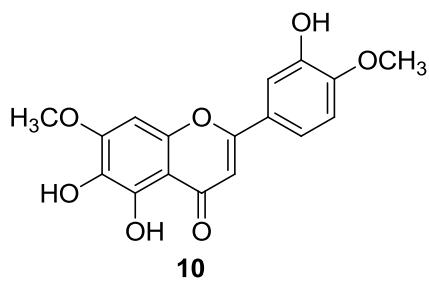


Figura 45. Estructura de la 7,4'-dimetoxi-5,6,3'-trihidroxiflavona (**10**).

Tabla 4. Desplazamientos químicos en RMN ¹H (500 MHz) y ¹³C (125 MHz) para los compuestos **7**, **8**, **11** y **13** determinados en CDCl₃.

Posición	7 ^a		8		11 ^c		13 ^d	
	δ _H (mult, J en Hz)	δ _C	δ _H (mult, J en Hz)	δ _C	δ _H (mult, J en Hz)	δ _C	δ _H (mult, J en Hz)	δ _C
1	4.49 t (5.0)	71.6, CH	4.55 ddd (8.0, 4.0, 1.0)	75.3, CH	4.54 ddd (8.0, 4.0, 1.0)	75.3, CH	4.58 m ^b	75.3, CH
2a	6.26 ddd (10.0, 5.0, 2.0)	126.6, CH	3.08 ddd (21.0, 8.0, 6.0)	31.0, CH ₂	3.06 ddd (20.5, 8.0, 6.5)	30.8, CH	3.08 ddd (21.0, 8.0, 6.5)	30.7, CH ₂
2b			2.78 ddd (21.0, 2.5, 1.0)		2.70 ddd (20.5, 2.5, 1.0)		2.75 dd a (21.0, 2.5)	
3	6.10 dd (10.0, 6.0)	122.9, CH	6.88 dd (6.0, 2.5)	134.0, CH	6.88 dd (6.5, 2.5)	133.4, CH	6.90 dd (6.5, 2.5)	133.8, CH
4	3.00 dd (6.0, 2.0)	49.2, CH		137.1, C		137.5, C		136.9, C
5		40.3, C		41.1, C		40.2, C		40.2, C
6α	1.87 m ^b	25.3, CH ₂	2.02 m ^b	31.6, CH ₂	2.20 d a (16.0) ^b	39.5, CH ₂	2.13 m ^b	38.9, CH ₂
6β	2.03 m ^b		1.67 dddd (14.5, 12.0, 8.0, 1.0)		2.03 dd (16.0, 4.0) ^b		2.13 m ^b	
7α	1.90 m ^b	25.4, CH ₂	1.91 m ^b	25.8, CH ₂		69.1, CH		68.1, CH
7β	2.15 dd (13.0, 8.5)		2.21 dd (14.5, 8.0)		4.42 dd (8.0, 2.0)		5.49 t (4.5)	
8		82.4, C		82.2, C		81.3, C		80.4, C
9		44.8, C		44.9, C		45.0, C		45.0, C
10α	2.06 m ^b	46.6, C	1.91 d (4.0) ^b	57.5, C	1.96 d (4.0)	57.6, C	1.99 d (4.0)	57.5, CH
11α	2.06 m ^b	43.2, CH ₂	2.02 m ^b	43.7, CH ₂	2.10 m ^b	44.7, CH ₂	2.13 m ^b	44.4, CH ₂
11β	2.06 m ^b		2.02 m ^b		2.04 m ^b		2.06 m ^b	
12	5.81 dd (11.5, 5.0)	71.8, CH	5.78 dd (12.0, 4.5)	72.0, CH	5.75 dd (12.0, 4.0)	72.3, CH	5.68 dd (12.0, 4.0)	71.6, CH
13		123.7, C		124.3, C		123.9, C		124.1, C
14	6.45 dd (2.0, 1.0)	107.8, CH	6.44 dd (2.0, 1.0)	108.4, CH	6.45 dd (2.0, 0.5)	108.3, CH	6.44 dd (2.0, 1.0)	108.3, CH
15	7.44 dd (2.0, 1.5)	143.1, CH	7.43 t (2.0)	143.8, CH	7.44 t (1.5)	143.9, CH	7.44 t (2.0)	143.9, CH
16	7.51 m	139.2, CH	7.49 m	139.8, CH	7.50 m	140.0, CH	7.49 m	139.9, CH
17		168.9, C		169.7, C		171.0, C		169.1, C
18		172.8, C		168.2, C		168.2, C		167.1, C
19 <i>pro R</i>	4.10 d (9.5)	76.3, CH ₂	4.50 d (9.5)	79.3, CH ₂	4.69 d (9.5)	80.4, CH ₂	4.57 d (9.0)	79.8, CH ₂
19 <i>pro S</i>	4.68 d (9.5)		4.24 dd (9.5, 1.0)		4.29 dd (9.5, 0.5)		4.30 d (9.0)	
20	1.30 s	23.6, CH ₃	1.21 s	22.9, CH ₃	1.49 s	23.3, CH ₃		23.5, CH ₃

^a Determinado en CDCl₃ + DMSO-*d*₆

^b Señales sobrepuestas

^c Señal de OH a δ_H 2.95 (s a)

^d Señales del acetato a δ_H 2.05 (s), δ_C 21.0 (CH₃), 168.0 (C)

6.2 Estudio químico de *Salvia shannoni* J. D. Smith

El estudio químico del extracto de las hojas de *Salvia shannoni* condujo al aislamiento de 10 *neo-clerodanos*, cuatro de ellos con estructura conocida (**4**, **14**, **17** y **21**) y seis más con estructura no descrita en la literatura especializada (**15**, **16**, **18-20** y **22**). Las estructuras de los diterpenos aislados se ilustran en la Figura 46 y la elucidación estructural de cada uno de los compuestos se discute a continuación.

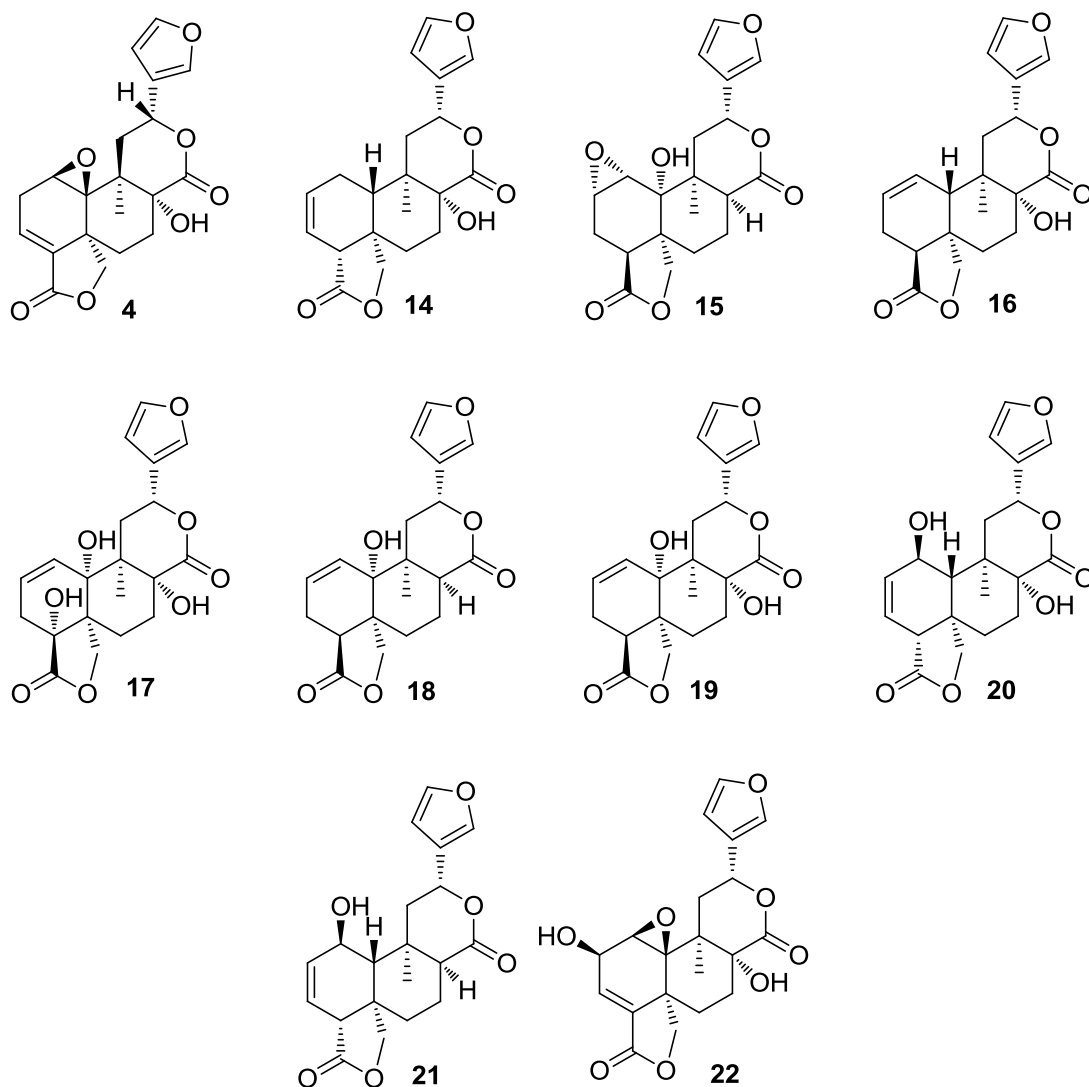


Figura 46. Diterpenos aislados de las hojas de *Salvia shannoni* J. D. Smith.

El compuesto **6** se aisló como un polvo amorfo de color blanco (42.8 mg), y se identificó como tehuana G por comparación de sus datos de MS-EI⁺, RMN ¹H y ¹³C (Tabla 3), con los datos del mismo compuesto, previamente aislado de *Salvia herbacea*.

El compuesto **14** se aisló como un sólido cristalino (8.64 g, 0.64 %) y es el componente aislado en mayor cantidad de esta planta. Su estructura se identificó como 8-hidroxisalviarina por comparación de sus datos de MS-EI⁺, RMN ¹H y ¹³C (Tabla 5) con los reportados para este compuesto que resultarán idénticos.⁹⁹

El compuesto **17** se aisló como un sólido cristalino (pf 282-284 °C, 687 mg, 0.051 %) y su estructura (Figura 46) se determinó por comparación de sus datos espectroscópicos de EM, RMN de ¹H y ¹³C, con los datos reportados para la infuscatina, sustancia previamente aislada de *Salvia infuscata*.⁴³

El compuesto **21** al igual que los dos compuestos anteriores, se identificó como esplenólida A al comparar sus datos espectroscópicos de RMN ¹H y ¹³C (Tabla 5) con los reportados en la literatura especializada.¹⁰⁰

Por su parte, el compuesto **20** presentó una fórmula molecular C₂₀H₂₂O₇, determinada por HRMS-FAB⁺. En el espectro de RMN ¹H (Tabla 5) se observaron señales para protones de un furano δ 7.45 (1H, t, *J* = 1.0 Hz, H-16), 7.39 (1H, t, *J* = 2.0 Hz, H-15) y 6.48 (1H, dd, *J* = 2.0, 1.0 Hz, H-14); una γ-lactona, δ 4.28 (1H, d, *J* = 9.0 Hz, H-19_{Pro-R}) y 4.17 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.0 Hz, H-19_{Pro-S}); y una δ-lactona, δ 5.80 (1H, dd, *J* = 12.5, 3.5 Hz, H-12), 2.64 (1H, dd, *J* = 14.0, 3.5 Hz, H-11β) y 2.44 (1H, m, H-11α). También se observaron dos señales características de protones vinílicos a δ 5.95 (1H, dt, *J* = 10.0, 2.5 Hz) y 5.56 (1H, ddd, *J* = 10.0, 3.0, 2.0 Hz), así como una señal base de alcohol a 4.44 (1H, ddd, *J* = 10.0, 4.0, 2.0 Hz). Las señales de los protones vinílicos tuvieron correlación entre sí en el espectro COSY (Figura 47) y se asignaron a los protones H-2, H-3 y H-1, respectivamente. Adicionalmente, H-1 correlaciona con una señal a δ 1.97 (1H, d, *J* = 10.0 Hz), asignada a H-10 (δ_C 43.4, CH). La señal de H-3 también presentó una correlación con otra señal a δ 2.75 (1H, c, 2.5), ésta se asignó a H-4 (δ_C 51.6, CH). Las correlaciones observadas en el espectro HMBC de H-10 con C-5 (δ_C 41.5, C), C-9 (δ_C 39.8, C) y C-20 (δ_C 17.3, CH₃); de H-2 con C-4 (δ_C 51.6, CH) y C-10; y de H-4 con C-18 (δ_C 174.6, C), C-19 (δ_C 70.2, CH₂) y C-6 (δ_C 32.1, CH₂) (Figura 47), corroboraron las asignaciones hechas a los protones de la molécula. El espectro de RMN ¹³C (Tabla 5) de **20** difiere del espectro de **21** por el desplazamiento de C-8 (δ_C 74.8, C), indicativo de carbonos base de alcohol. Como ya se ha discutido anteriormente (pag. 39), el cambio en el desplazamiento a campo alto de las señales que corresponden a C-11 (35.4, CH₂) y C-20 (δ_C 17.3, CH₃) en el espectro de **20** con respecto a las mismas señales en el espectro de **21** (δ_C 43.8, CH₂, C-11; 24.2, CH₃, C-20) determinan una orientación α del hidroxilo en C-8. La posición del grupo hidroxilo se puede comprobar por las correlaciones HMBC (Figura 47) de C-8 con H-7's, H-10, H-11's y H₃-20.

Tabla 5. Desplazamientos químicos de RMN ¹H (500 MHz) y ¹³C (125 MHz) de los compuestos **14**, **20** y **21**.

Posición	14		20 ^b		21	
	δ_H (mult, J en Hz)	δ_C	δ_H (mult, J en Hz)	δ_C	δ_H (mult, J en Hz)	δ_C
1 α	2.16 m ^a	22.1, CH ₂	4.44 ddd (10.0, 4.0, 2.0)	64.4, CH	4.44 ddd (10.0, 4.5, 2.5)	66.0, CH
1 β	2.16 m ^a					
2	6.03 ddd (10.0, 5.0, 2.5)	128.5, CH	5.95 dt (10.0, 2.5)	135.1, CH	5.88 dt (10.0, 2.5)	134.1, CH
3	5.66 ddd (10.0, 5.0, 1.5)	121.1, CH	5.56 ddd (10.0, 3.0, 2.0)	118.8, CH	5.67 ddd (10.0, 2.5, 1.5)	121.5, CH
4	2.77 quin (3.0)	52.1, CH	2.75 q (2.5)	51.6, CH	2.82 q (2.5)	52.1, CH
5		41.0, C		41.5, C		42.3, C
6 α	2.00 m ^a	33.3, CH ₂	1.78 dd (14.5, 4.0)	32.1, CH ₂	1.81 dddd (14.0, 3.5, 3.5, 1.0)	31.9, CH ₂
6 β	1.36 dddd (14.0, 14.0, 3.5, 1.5)		1.36 dddd (14.5, 14.5, 4.0, 2.0)		1.37 dddd (14.0, 14.0, 3.5, 2.0)	
7 α	1.86 ddd (14.0, 4.0, 2.0)	27.8, CH ₂	1.85 ddd (17.5, 6.5, 4.0)	26.4, CH ₂	1.89 tt (14.0, 3.5)	18.8, CH ₂
7 β	2.46 dt (13.5, 3.0)		2.48 m ^a		2.49 ddd (14.5, 6.5, 3.0)	
8		75.7, C		74.8, C	2.41 m	50.6, CH
9		39.3, C		39.8, C		35.8, C
10	2.00 m ^a	38.1, CH	1.97 d (10.0)	43.4, CH	2.06 d (10.0)	44.2, CH
11 α	2.51 dd (14.5, 13.0)	34.2, CH ₂	2.44 m ^a	35.4, CH ₂	1.67 dd (14.0, 12.0)	43.8, CH ₂
11 β	1.89 dd (15.0, 4.0)		2.64 dd (14.0, 3.5)		3.04 dd (14.0, 3.0)	
12	5.33 dd (13.0, 4.0)	71.2, CH	5.80 dd (12.5, 3.5)	71.9, CH	5.70 dd (12.0, 3.0)	72.1, CH
13		124.5, C		125.2, C		125.4, C
14	6.46 dd (2.0, 1.0)	108.5, CH	6.48 dd (2.0, 1.0)	108.3, CH	6.39 dd (2.0, 1.0)	108.3, CH
15	7.42 t (2.0)	143.8, CH	7.39 t (2.0)	142.6, CH	7.40 t (2.0)	143.6, CH
16	7.50 m	139.9, CH	7.45 t (1.0)	139.0, CH	7.42 dd (2.0, 1.0)	139.3, CH
17		171.9, C		172.1, C		171.8, C
18		175.2, C		174.6, C		174.7, C
19 <i>pro R</i>	4.23 d (9.0)	70.0, CH ₂	4.28 d (9.0)	70.2, CH ₂	4.31 d (9.5)	70.5, CH ₂
19 <i>pro S</i>	4.21 dd (9.0, 1.5)		4.17 dd (9.0, 2.0)		4.13 dd (9.5, 2.0)	
20	0.99 s	17.3, CH ₃	1.06 s	17.3, CH ₃	1.13 s	24.2, CH ₃

^a Señales sobrepuestas

^b Determinado en CDCl₃ + DMSO-*d*₆

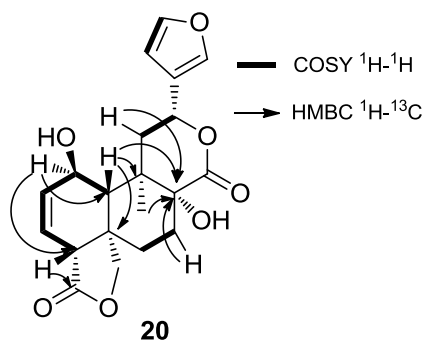


Figura 47. Principales correlaciones COSY y HMBC observadas para el compuesto **20**.

El compuesto **16** se aisló como un sólido cristalino (pf 261-263 °C, 194.1 mg, 0.014 %). En su espectro de HRMS-FAB⁺ se observó un ión pseudomolecular [M]⁺ a *m/z* 358.1414, congruente con una fórmula molecular C₂₀H₂₂O₆. En su espectro de RMN ¹³C (Tabla 6) se observaron 20 señales y en el espectro DEPT se observaron señales para un metilo, cinco metilenos (uno base de oxígeno y cuatro alifáticos),

ocho metinos (tres aromáticos, dos vinílicos, dos alifáticos y uno base de oxígeno). En el espectro en el IR de **16** se observaron bandas para un grupo hidroxilo (3409 cm^{-1}), una γ -lactona (1760 cm^{-1}), una δ -lactona (1718 cm^{-1}) y un furano (1508 y 874 cm^{-1}). En el espectro de RMN ^1H (Tabla 6) se observaron dos señales características de un doble enlace disustituido a δ 5.92 (1H, m) y 5.79 (1H, ddd, 10.5, 4.0, 2.0). Estas señales tuvieron correlación entre sí en el espectro COSY (Figura 48) y se asignaron a H-2 (δ_{C} 128.4, CH) y H-1 (δ_{C} 127.9, CH), respectivamente. La señal de H-1 tuvo correlación con una señal a δ 2.44 (1H, m), indicando que esta señal corresponde a un proton vecinal a H-1, por lo que ésta se asignó a H-10 (δ_{C} 51.2, CH). Por su parte, en el espectro HMBC (Figura 48), la señal asignada a H-2 tuvo acoplamiento con C-1, C-10 y con una señal a δ_{C} 21.1 (CH_2 , C-3). En el espectro COSY (Figura 48), las señales de los protones H-3a (1H, 2.40, m) y H3b (1H, 2.24, m) tuvieron una interacción con una señal a δ 2.49 (1H, dd, 11.0, 5.5), esta señal se asignó a H-4 (δ_{C} 46.1, CH). Lo anterior indicó que el compuesto **16** posee en su estructura sólo una doble ligadura 1,2 en el anillo A del esqueleto de clerodano. En el espectro de RMN de ^{13}C (Tabla 6) se observó una señal con δ_{C} 73.2 (C), indicando la presencia de un grupo hidroxilo en C-8, por lo que la estructura de **16** se estableció como la ilustrada en la Figura 46.

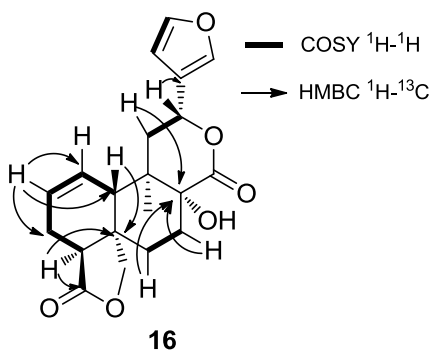


Figura 48. Principales correlaciones COSY y HMBC observadas para el compuesto **16**.

El valor de las constantes de acoplamiento entre los protones del metileno en C-11 y H-12 ($J_{11\alpha-12} = 10.0$ y $J_{11\beta-12} = 6.0\text{ Hz}$), indican una orientación α -ecuatorial para el anillo de furano. Las correlaciones observadas en el espectro NOESY (Figura 49) entre H₃-20 y H₂-19, indicaron un metileno C-19 con orientación alfa y la interacción de H-10 con H-12 β son indicativas de una decalina con fusión *trans* de los anillos A y B. La interacción de H-19_{pro-S} con H-4 sugirió una 18,19- γ -lactona con fusión *trans*. El cambio en el desplazamiento a campo alto de C-7 en **16** con respecto a **18** (Tabla 6) determinó una orientación α del grupo hidroxilo.

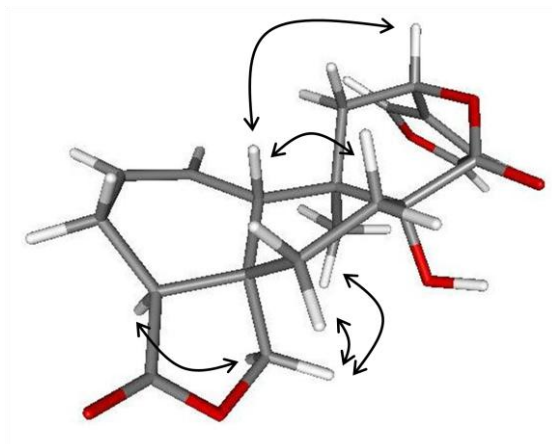


Figura 49. Correlaciones NOE observadas para **16**.

El compuesto **19** se aisló como un sólido cristalino e incoloro con pf 254-256 °C, en su espectro de HRMS-FAB⁺ se observó un ión molecular [M]⁺ a *m/z* 374.1369, congruente con una fórmula molecular C₂₀H₂₂O₇, la fórmula condensada indica que este compuesto tiene un átomo de oxígeno menos en su estructura con respecto a **17**. En el espectro de RMN ¹H de **19** se observaron señales con desplazamientos similares a los que posee **17** en su espectro, con excepción de la señal a δ 3.07 (1H, dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz), asignada a H-4 en **19** por las correlaciones homonucleares observadas en el espectro COSY (Figura 50) de H-4 con H-3's y por las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC (Figura 50) de H-4 con C-3 (δ_C 22.0, CH₂), C-5 (δ_C 47.7, C), C-6 (δ_C 21.9, CH₂), C-10 (δ_C 75.3, C) y C-18 (δ_C 178.4, C). Esto corrobora que la diferencia entre **19** y **17** radica en que **19** no contiene un grupo hidroxilo en C-4.

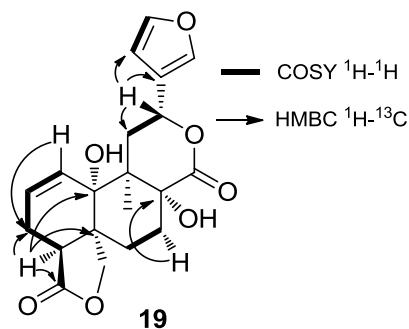


Figura 50. Correlaciones homo y heteronucleares observadas para **19**.

Tabla 6. Desplazamientos de RMN ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) para los compuestos **16-19**, determinados en CDCl_3 .

Posición.	16		17 ^b		18 ^a		19 ^b	
	δ_{H} (mult, <i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, <i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, <i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, <i>J</i> en Hz)	δ_{C}
1	5.79 ddd (10.5, 4.0, 2.0)	127.9, CH	6.03 dt (10.0, 1.5)	131.0, CH	5.86 m	130.4, CH	5.93 m ^c	131.0, CH
2	5.92 m ^c	128.4, CH	5.84 ddd (10.0, 4.5, 3.0)	126.3, CH	5.81 ddd (10.0, 4.5, 2.0)	129.4, CH	5.93 m ^c	131.5, CH
3 α	2.40 m ^c	21.1, CH ₂	2.39 m ^c	29.2, CH ₂	1.93 m ^c	21.0, CH ₂	2.06 m ^c	22.0, CH ₂
3 β	2.24 m ^c		2.39 m ^c		2.15 dddd (17.5, 5.5, 5.5, 1.0)		2.32 ddd (15.0, 6.0, 4.0)	
4	2.49 dd (11.0, 5.5)	46.1, CH		77.1, C	3.05 dd (11.0, 5.5)	40.7, CH	3.07 dd (12.0, 6.0)	41.3, CH
5		41.2, C		48.3, C		46.5, C		47.7, C
6 α	1.68 m ^c	20.4, CH ₂	1.42 dt (14.0, 4.0)	25.3, CH ₂	1.57 ddd (13.5, 13.5, 4.0)	20.4, CH ₂	2.82 dt (14.0, 4.0)	21.9, CH ₂
6 β	1.68 m ^c		1.51 ddd (14.0, 3.5, 2.0)		1.14 m ^c		1.61 dddd (14.0, 14.0, 4.0, 2.0)	
7 α	2.23 m ^c	29.4, CH ₂	1.81 ddd (13.5, 13.5, 4.0)	26.2, CH ₂	1.84 m ^c	15.8, CH ₂	1.79 ddd (13.5, 13.5, 4.0)	26.2, CH ₂
7 β	1.83 ddd (14.0, 8.0, 6.0)		2.31 dt (13.5, 3.5)		1.71 m		2.28 m	
8		73.2, C		72.4, C	2.39 d a (4.0)	42.8, CH		73.1, C
9		40.4, C		48.1, C		40.0, C		48.8, C
10	2.44 m ^c	51.2, CH		76.7, C		73.5, C		75.3, C
11 α	2.09 dd (15.0, 10.0)	40.0, CH ₂	2.09 dd (14.5, 8.5)	32.7, CH ₂	2.88 dd (16.0, 8.5)	33.6, CH ₂	2.04 m ^c	33.8, CH ₂
11 β	2.36 dd (15.0, 6.0)		2.69 dd (14.5, 9.0)		1.88 m ^c		2.59 dd (15.0, 9.0)	
12	5.58 dd (10.0, 6.0)	72.2, CH	5.67 t (9.0)	73.8, CH	5.62 dt (8.5, 1.5)	70.4, CH	5.63 t (9.,0)	73.4, CH
13		125.5, C		128.1, C		127.1, C		128.6, C
14	6.50 d (2.0)	108.4, CH	6.64 dd (1.5, 0.5)	109.3, CH	6.39 dd (2.0, 1.0)	108.4, CH	6.63 dd (1.5, 0.5)	109.6, CH
15	7.43 t (2.0)	144.0, CH	7.35 t (1.5)	140.5, CH	7.56 t (2.0)	144.0, CH	7.38 t (1.5)	144.2, CH
16	7.50 br s	139.9, CH	7.51 m	143.9, CH	7.54 dd (2.0, 1.0)	138.7, CH	7.49 br d (0.5)	140.8, CH
17		174.0, C		172.5, C		175.7, C		173.0, C
18		175.7, C		175.9, C		171.9, C		178.4, C
19 <i>pro R</i>	4.79 d (8.5)	78.5, CH ₂	4.40 d (8.5)	72.4, CH ₂	4.26 m ^c	71.1, CH ₂	4.34 d (8.5)	74.0, CH ₂
19 <i>pro S</i>	4.04 dd 88.5, 1.0)		4.95 dd (8.5, 2.0)		4.26 m ^c		4.48 dd (8.5, 2.0)	
20	1.14 s	27.2, CH ₃	1.11 s	20.0, CH ₃	1.13 s ^c	26.2, CH ₃	1.05 s	19.8, CH ₃

^aDeterminado en CDCl_3 + $\text{DMSO-}d_6$

^bDeterminado en CDCl_3 + CD_3OD

^cSeñales sobrepuestas

Las correlaciones NOE (Figura 51) de H-19_{Pro-R} y H-19_{Pro-S} con H₃-20 indicaron una orientación α -ecuatorial del metileno en C-19 y las interacciones de H-4 con 19_{Pro-R} y H-19_{Pro-S} determinaron que la γ -lactona en **19** tiene una fusión *trans*, por lo que la estereoquímica de **19** en su mayor parte es consistente con la descrita para **17**. Adicionalmente, se corroboró la estructura de **19** mediante difracción de rayos-X de monocristal, su diagrama ORTEP se muestra en la Figura 52. Esta determinación cristalográfica dió sustento a la orientación α del grupo hidroxilo en C-8 de otros diterpenos cuya elucidación estructural se discutió anteriormente.

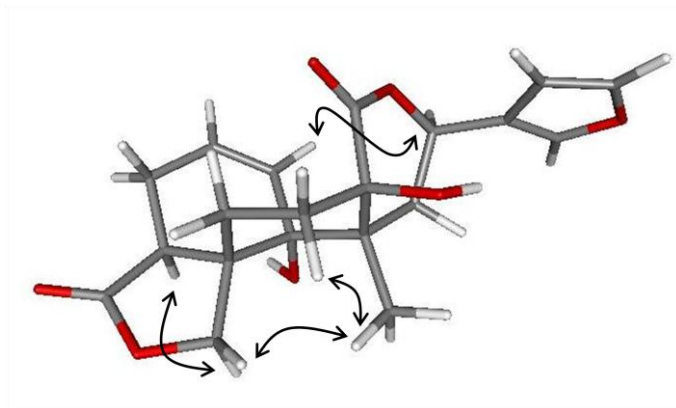


Figura 51. Correlaciones NOE observadas para **19**.

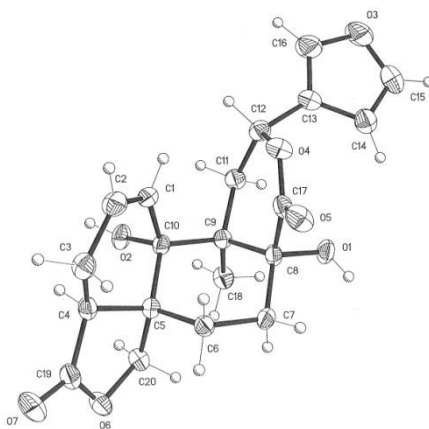


Figura 52. Diagrama ORTEP del compuesto **19**.

El compuesto **18**, es isomérico con **16** ya que posee la misma fórmula molecular que **16** (C₂₀H₂₂O₆). El espectro de RMN ¹H de **18** (Tabla 6) difirió del espectro de **16** en dos señales desplazadas a campo bajo. La primera de ellas con desplazamiento característico de protón α a grupo carbonilo (1H, 3.05, dd, $J = 11.0, 5.5$ Hz) y fue asignada a H-4 por las correlaciones observadas en el espectro COSY (Figura 53) con H-3a (1H, 1.93, m) y H-3b (1H, 2.15, dddd, $J = 17.5, 5.5, 5.5, 1.5$ Hz). En el espectro HMBC (Figura 52)

se observaron interacciones heteronucleares de H-4 con C-3 (δ_C 21.0, CH₂), C-5 (δ_C 46.5, C), C-9 (δ_C 40.0, C), C-18 (δ_C 171.9, C) y C-19 (71.1, CH₂). Adicionalmente, en el espectro de RMN ¹H de **18** se observó una señal a δ 2.39 (1H, d a, 4.0) y se asignó a H-8 por las correlaciones observadas en el espectro HMBC (Figura 53) de H-8 con C-6 (δ_C 20.4, CH₂), C-7 (δ_C 15.8, CH₂), C-9 (δ_C 40.0, C), C-17 (δ_C 175.7, C) y C-20 (26.2, CH₃). El desplazamiento de la señal de C-10 en el espectro de RMN de ¹³C (Tabla 6) sugirió la presencia de un grupo hidroxilo en el mismo átomo de carbono. Esta suposición se sustentó por la correlación existente en el espectro HMBC (Figura 53) de C-10 con las señales de H-1 (δ 5.86, 1H, m), H-2 (δ 5.81, 1H, ddd, $J = 10.0, 4.5, 2.0$ Hz), H-11 α (δ 2.88, 1H, dd, $J = 16.0, 8.5$ Hz) y H-11 β (δ 1.88, 1H, m).

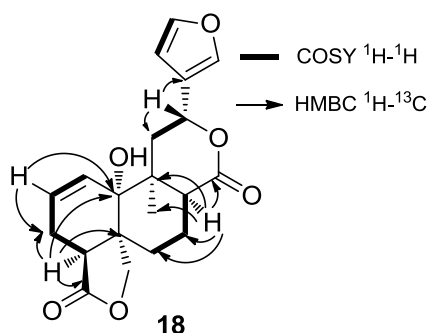


Figura 53. Correlaciones observadas en los espectros COSY y HMBC de **18**.

El compuesto **15** se aisló como un sólido cristalino, su fórmula molecular se determinó por HRMS-FAB⁺ que dió un ión pseudomolecular [M+H]⁺ a m/z 375.1445 (C₂₀H₂₂O₇). El espectro en el IR presentó bandas para γ y δ -lactonas, un grupo hidroxilo y un furano. En el espectro de RMN de ¹³C (Tabla 7) se observaron 20 señales, en el experimento DEPT, se observan señales para un grupo metilo, cinco metilenos, ocho metinos y seis carbonos cuaternarios.

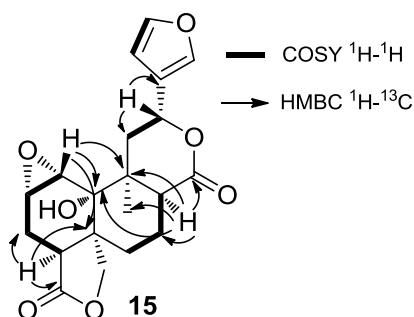


Figura 54. Principales correlaciones homo y heteronucleares de **15**.

En el espectro de RMN de ¹H de **15** (Tabla 7) se observaron dos señales a δ 3.61 (1H, m) y 3.37 (1H, d, $J = 3.5$ Hz), ambas señales presentaron correlación entre sí en el espectro COSY (Figura 53), estas señales

se asignaron a H-2 y H-1, respectivamente y corresponden por su desplazamiento a protones base de epóxido. La señal de H-2 tuvo un acoplamiento adicional con una señal a δ 1.91 (1H, ddd, $J = 15.5, 12.5, 2.5$ Hz, H-3b), esta señal también mostró interacciones con otras señales a δ 2.43 (1H, ddd, $J = 15.5, 5.5, 1.5$ Hz, H-3a; δ_C 19.7, CH₂, C-3) y 2.69 (1H, dd, $J = 12.5, 5.0$ Hz, H-4; δ_C 35.9, CH, C-4). Las correlaciones observadas en el espectro HMBC (Figura 53) de H-4 con C-3, C-5 (δ_C 47.2, C), C-10 (δ_C 73.4, C) y C-18 (δ_C 175.5, C); así como las correlaciones de H-1 con C-5, C-9 (δ_C 41.7, C) y C-10, confirmaron las asignaciones atribuidas a las señales de los protones en el anillo A del esqueleto de clerodano. En el espectro COSY se observó un segundo sistema de señales que correlacionan entre sí, este sistema presentó correlación entre una señal a δ 2.67 (1H, m, H-8) con las que aparecen a 2.16 (1H, m, H-7a), 1.70 (1H, m, H-7b; δ_C 16.4, CH₂), 1.37 (1H, ddd, $J = 11.0, 3.0, 1.0$ Hz, H-6a) y 1.69 (1H, m, H-6b; δ_C 21.2, CH₂). La señal que corresponde a H-8 se confirmó por las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC de este hidrógeno con C-7, C-9, C-10, C-17 (δ_C 173.1, C) y C-20 (δ_C 26.7, CH₃). Adicionalmente, el desplazamiento de C-10 indicó la presencia de un grupo hidroxilo (δ_C 73.4, C) en la estructura de **15**, tal como sucede en el caso de **17**, **18** y **19** (Tabla 6).

Las correlaciones observadas en el espectro NOESY (Figura 55) de H-11 α (δ_H 2.14, 1H, m) con H₃-20 (δ_H 1.29, 3H, s) y de H-11 β (δ_H 2.98, 1H, dd, $J = 16.0, 8.0$ Hz) con H-12 (δ_H 5.71, 1H, dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz) determinaron la orientación del anillo de furano como α -ecuatorial. La correlación de H-8 con H₃-20 establece una δ -lactona con fusión *cis*. La interacción de H₃-20 (asumiendo que sea α como la mayoría de los clerodanos) con los protones H-19_{Pro-S} (δ_H 4.26, 1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz) y H-19_{Pro-R} (δ_H 4.20, 1H, d, $J = 8.5$ Hz) determinaron una orientación α del metileno en C-19; por otra parte H-19_{Pro-S} presentó una correlación adicional con H-4, esta interacción determinó que la γ -lactona posee una fusión *trans*. La orientación del grupo hidroxilo se determinó como α dada la interacción de H-4 con OH-10. Por su parte, la interacción observada de las señales de H-1 y H-2 con H-6 β , sólo puede suceder si el grupo 1,2-epoxi está α orientado (Figura 55).

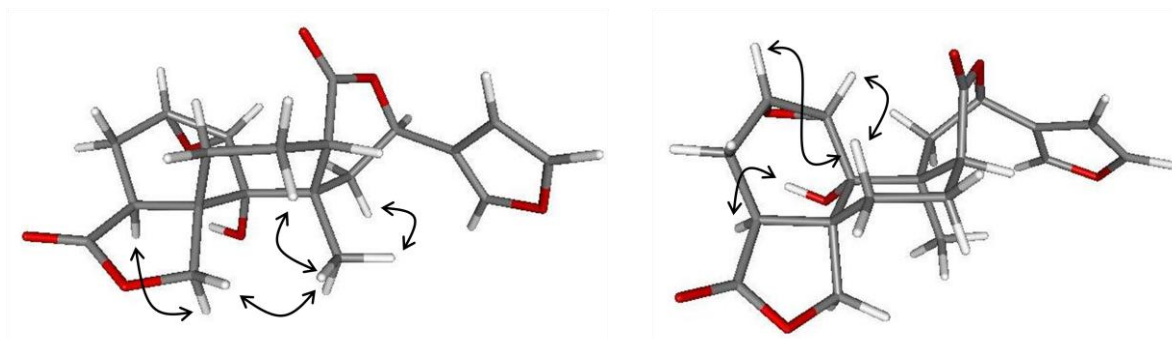


Figura 55. Correlaciones NOE observadas para **15**.

El compuesto **22** se aisló como un sólido cristalino incoloro, en su espectro de HRMS-FAB⁺ se observó un ión molecular [M]⁺ a *m/z* 388, congruente con la fórmula C₂₀H₂₀O₈. Su espectro en el IR presentó bandas para grupos hidroxilo, un furano, una γ y una δ -lactona. En su espectro de RMN de ¹H (Tabla 7) se observaron señales que confirmaron la presencia del anillo de furano (δ_{H} 7.47, 1H, t, $J = 1.5$ Hz, H-15; 7.39, 1H, m, H-16; δ_{H} 6.40, 1H, m, H-14), una γ -lactona (δ_{H} 4.94, 1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-19_{pro-R}; 4.28, 1H, dd, $J = 7.5, 2.0$ Hz, H-19_{pro-S}) y una δ -lactona (δ_{H} 5.56, 1H, dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz, H-12; δ_{H} 1.98, 1H, m, H-11a; δ_{H} 1.91, 1H, m, H-11b).

En el espectro COSY (Figura 56) se observó un sistema de señales que correlacionaron entre sí; una de ellas característica de un protón base de epóxido a δ_{H} 3.61 (1H, t, $J = 1.5$ Hz), tuvo acoplamiento con otra señal base de alcohol a δ_{H} 4.65 (1H, dd, $J = 3.0, 1.5$ Hz), la cual a su vez correlacionó con una señal de protón vinílico a δ_{H} 6.39 (1H, dd, 3.0, 1.5 Hz). Estas señales se asignaron a H-1, H-2 y H-3, respectivamente. Como confirmación de lo antes señalado están las correlaciones observadas en el espectro HMBC (Figura 55) de H-1 con C-2 (δ_{C} 62.9, CH) y C-3 (δ_{C} 129.3, CH), de H-3 con C-1 (δ_{C} 58.0, CH), C-5 (δ_{C} 41.7, C) y C-18 (168.4, C), estableciendo que **22** posee en su estructura un grupo 1,10-epoxi y un hidroxilo en C-2. Adicionalmente, en el espectro de RMN de ¹³C (Tabla 7) se observó una señal de carbono cuaternario base de oxígeno a δ_{C} 73.8 (C), asignada C-8. Esta asignación se corroboró por las correlaciones observadas en el espectro HMBC de C-8 con H-6a (δ_{H} 2.06, 1H, m), H-7a (δ_{H} 2.63, 1H, m) y H₃-20 (δ_{H} 1.11, 1H, s).

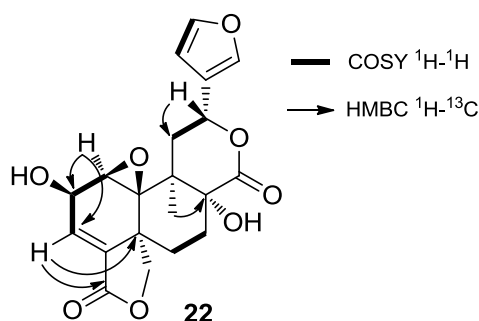


Figura 56. Correlaciones observadas para **22** en los espectros COSY y HMBC.

La correlación observada en el espectro NOESY (Figura 57) entre H-1 y H₃-20 estableció un epóxido α orientado. El cambio en el desplazamiento de C-11 (δ_{C} 37.1, CH₂) y C-20 (δ_{C} 20.5, CH₃) en el espectro de RMN de ¹³C de **22** con respecto a **9** (δ_{C} 39.3, CH₂, C-11; 26.0, CH₃, C-20) estableció un grupo hidroxilo en C-8 con orientación α (Tabla 7). Los valores de J observados para H-12 ($J_{11\alpha-12} = 12.0$ y $J_{11\beta-12} = 3.0$ Hz) fueron indicativos de una orientación α -ecuatorial del anillo de furano. La interacción en el espectro

NOESY (Figura 57) de H-1 con H-2 indica que los protones están del mismo lado, esto es apoyado por el valor de las constantes de acoplamiento de H-2 con H-1 ($J_{1\alpha-2} = 1.5$ Hz) y H-3 ($J_{3-2} = 3.0$ Hz); debido a lo anterior la orientación propuesta para el hidroxilo en C-2 se determinó como β .

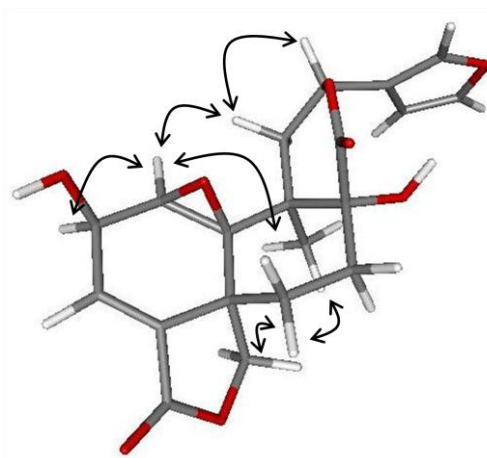


Figura 57. Correlaciones NOE observadas para **22**.

Tabla 7. Desplazamientos de RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) para los compuestos **15** y **22**, determinados en CDCl_3 .

Posición.	15		22 ^a	
	δ_{H} (mult, J en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, J en Hz)	δ_{C}
1	3.37 d (3.5)	56.1, CH	3.61 t (1.5)	58.0, CH
2	3.61 m	58.8, CH	4.65 dd (3.0, 1.5)	62.9, CH
3a	2.43 ddd (15.5, 5.0, 1.5)	19.7, CH ₂	6.39 dd (3.0, 1.5)	129.3, CH
3b	1.91 ddd (15.5, 12.5, 2.5)			
4	2.69 dd (12.5, 5.0)	35.9, CH		132.6, C
5		47.2, C		41.7, C
6a	1.37 ddd (11.0, 3.0, 1.0)	21.2, CH ₂	2.06 m ^b	26.6, CH ₂
6b	1.69 m ^b		1.91 m ^b	
7a	2.16 m ^b	16.4, CH ₂	2.63 m	28.5, CH ₂
7b	1.70 m ^b		1.93 m ^b	
8	2.67 m	43.4, CH		73.8, C
9		41.7, C		42.0, C
10		73.4, C		65.2, C
11a	2.14 m ^b	35.0, CH ₂	1.98 m ^b	37.1, CH ₂
11b	2.98 dd (16.0, 8.0)		1.91 m ^b	
12	5.71 dd (8.0, 1.5)	71.8, CH	5.56 dd (12.0, 3.0)	71.7, CH
13		126.3, C		124.5, C
14	6.40 m	108.6, CH	6.46 dd (2.0, 1.0)	107.8, CH
15	7.47 t (1.5)	144.5, CH	7.42 t (2.0)	143.0, CH
16	7.39 m	138.7, CH	7.48 m	139.2, CH
17		173.1, C		173.7, C
18		175.5, C		168.4, C
19 <i>pro R</i>	4.20 d (8.5)	70.4, CH ₂	4.94 d (7.5)	73.3, CH ₂
19 <i>pro S</i>	4.26 dd (8.5, 2.0)		4.28 dd (7.5, 2.0)	
20	1.29 s	26.7, CH ₃	1.11 s	20.5, CH ₃

^aDeterminado en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO}$

^bSeñales sobrepuestas

6.3 Estudio químico de *Salvia microphylla* Kunth

A partir del extracto de las hojas y flores de *Salvia microphylla* Kunth, obtenido con acetona se aislaron cinco diterpenos (Figura 58) con estructura que no ha sido descrita previamente, dos de ellos son 5,10-*seco-neo*-clerodanos (**23** y **24**), dos *neo*-clerodanos (**25** y **27**) y un diterpeno con esqueleto rearrreglado de clerodano (**26**).

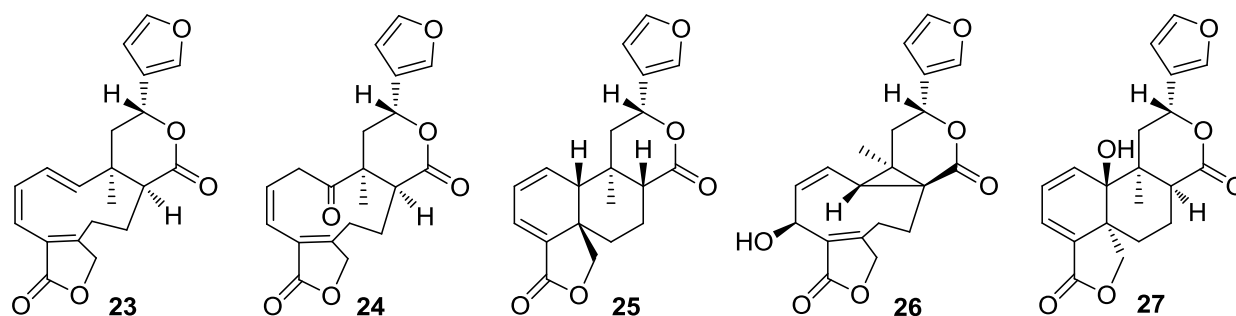


Figura 58. Diterpenos aislados de las hojas y flores de *Salvia microphylla* Kunth.

El compuesto **23** se aisló como un sólido amorfo de color amarillento. Su fórmula molecular $C_{20}H_{20}O_5$ se determinó por su espectro de HRMS-FAB⁺. En su espectro en el IR se observaron señales para un furano, una γ y una δ -lactonas. Las señales observadas en el espectro de RMN de 1H (Tabla 8) confirmaron la presencia del anillo de furano (δ_H 7.48, 1H, s a, H-16; 7.42, 1H, t, $J = 2.0$ Hz, H-15; 6.43, 1H, t, $J = 1.0$ Hz, H-14), la γ -lactona (δ_H 4.96, 1H, s a, H-19_{Pro-R}; 4.69, 1H, d, $J = 17.0$ Hz, H-19_{Pro-S}) y la δ -lactona (δ_H 5.60, 1H, dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz, H-12; 2.13, 1H, dd, $J = 14.0, 3.0$ Hz, H-11 β ; 2.03, 1H, dd, $J = 14.0, 12.5$ Hz, H-11 α). Adicionalmente, se observaron señales para cuatro protones vinílicos a δ_H 6.48 (1H, m), 6.23 (1H, dd, $J = 16.5, 4.5$ Hz), 6.12 (1H, d, $J = 11.5$ Hz) y 6.12 (1H, m). En el espectro COSY (Figura 59) este conjunto de señales tuvo correlaciones y se asignaron a los protones H-2, H-1, H-3 y H-10, respectivamente. Lo anterior implicó que la decalina del esqueleto de clerodano este modificado, esto se confirmó por las correlaciones heteronucleares observadas en el espectro HMBC (Figura 59) de H-3 con C-2 (δ 131.2, CH) y C-18 (δ 174.0, C); y por las de H-10 con C-1 (δ 129.6, CH) y C-2 que establecen una estructura de 5,10 *seco*-clerodano.

En el espectro HSQC se observó una señal compleja (sobrepuesta) a δ_H 2.62 (2H, m) que tuvo con dos señales de carbono a δ 53.4 (CH, C-8) y 24.5 (CH₂, C-7). Esta señal se asignó a los protones H-8 y H-7a. En el espectro COSY (Figura 58), la señal de H-7a correlaciona con la señal a δ_H 2.29 (1H, d a, $J = 10.5$ Hz), asignada a H-6b (δ 26.9, CH₂). Estas asignaciones se confirmaron por las correlaciones

heteronucleares observadas en el espectro HMBC (Figura 58) de H-8 con C-10 (δ 136.1, CH) y C-17 (δ 171.1, C); de H-7a con C-6, C-7 y C-8; de H-6b con C-7, C-8 y C-19 (δ 72.3, CH₂).

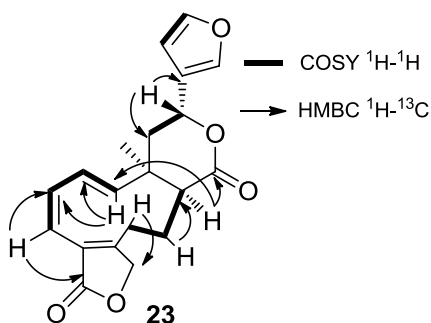


Figura 59. Correlaciones homo y heteronucleares de **23**.

De acuerdo con lo hasta ahora discutido de las características espectroscópicas de esta molécula, la estructura de **23** se determinó como la ilustrada en la Figura 59. Es importante hacer notar que al tener un anillo de 10 miembros en su estructura, es probable que **23** adopte diferentes conformaciones, lo anterior se infiere por el ensanchamiento de algunas de las señales en los espectros de RMN de ¹H y en ¹³C, la presencia de señales demasiado pequeñas y la ausencia de la señal para C-5 en el espectro de RMN de ¹³C. El análisis conformacional no se llevó a cabo por la poca cantidad de muestra que se obtuvo.

Por otra parte, el valor de las constantes de acoplamiento de H-12 ($J_{11\alpha-12} = 12.0$ y $J_{11\beta-12} = 3.0$ Hz) estableció que el anillo de furano posee una orientación α -ecuatorial. Las correlaciones observadas en el espectro NOESY de H-8 con H₃-20 determinaron que la δ -lactona está *cis*-fusionada en la estructura de **23**.

El siguiente compuesto que se aisló de esta planta fue el compuesto **24**, en su espectro de masas se observó un ión pseudomolecular $[M+H]^+$ a m/z 357.1328 congruente con la fórmula C₂₀H₂₀O₆. La estructura de este compuesto se determinó por comparación con los datos espectroscópicos de RMN de ¹H y ¹³C reportados para la cardiofilidina, un *ent-neo*-clerodano aislado de *Salvia cardiophylla*.²⁶ Sin embargo, el desplazamiento de las señales de los protones H-8, H-11 β y H-12 (Tabla 8) no coincidieron con las de **24**. Adicionalmente, el valor de las constantes de acoplamiento de H-12 ($J_{11\alpha-12} = 10.0$ y $J_{11\beta-12} = 5.5$ Hz) indicó una orientación del anillo de furano contraria a la descrita para la cardiofilidina. En el espectro NOESY se observaron correlaciones de H₃-20 con H-8, este hecho establece que la 17,12 δ -lactona está *cis*-fusionada. Las consideraciones anteriores indicaron que **24** es un diastereómero de la cardiofilidina, con una configuración contraria en C-9 y C-12. Esta diferencia entre la cardiofilidina y el

compuesto **24** se corroboró por medio de un análisis de difracción de rayos-X de monocristal (Figura 60) y posterior comparación de sus constantes de celda ($a = 10.873(1)$, $b = 6.655(1)$, $c = 12.789(1)$ Å, $V = 894$ Å³, $D_C = 1.324$ g/cm³, $Z = 2$), observándose que difieren significativamente con las constantes descritas para la cardiofilidina²⁶ ($a = 7.040(1)$, $b = 13.442(4)$, $c = 18.699(2)$ Å, $V = 1769$ Å³, $D_C = 1.340$ g/cm³, $Z = 4$).

Tabla 8. Desplazamientos de RMN de ¹H (500 MHz) y ¹³C (125 MHz) para los compuestos **23**, **24** y **26**, determinados en CDCl₃.

Posición.	23		24		26	
	δ_H (mult, J en Hz)	δ_C	δ_H (mult, J en Hz)	δ_C	δ_H (mult, J en Hz)	δ_C
1a	6.23 dd (16.5, 4.5)	129.6, CH	3.48 dd (16.5, 10.5)	40.1, CH ₂	5.99 dd (11.0, 6.5)	130.9, CH
1b			3.09 dd (16.5, 6.0)			
2	7.48 m ^a	131.2, CH	6.22 ddd (11.0, 10.5, 6.0)	130.1, CH	6.23 ddd (11.0, 7.5, 2.0)	133.5, CH
3	6.12 d (11.5) ^a	121.3, CH	6.13 d a (11.0)	121.3, CH	5.11 br d (7.0)	63.6, CH
4		123.0, C		124.6, C		126.3, C
5		n a		161.5, C		160.6, C
6 α	2.92 s a	26.9, CH ₂	2.62 m ^a	24.6, CH ₂	2.18 ddd (12.0, 8.0, 1.0)	20.3, CH ₂
6 β	2.29 d a (10.5)		2.18 m		3.39 ddd (15.0, 12.0, 10.0)	
7 α	2.62 m ^a	24.5, CH ₂	1.94 m	25.1, CH ₂	2.70 ddd (15.0, 10.0, 8.5)	23.5, CH ₂
7 β	1.87 s a		2.56ma		1.71 ddd (15.0, 9.0, 1.5)	
8	2.62 m ^a	53.4, CH	2.80 dd (6.0, 4.0)	49.2, CH		32.6, C
9		39.0, C		49.5, C		29.0, C
10	6.12 m ^a	136.1, CH		211.6, C	3.62 dd (6.5, 2.0)	25.5, C
11 α	2.03 dd (14.0, 12.0)	42.0, CH ₂	1.83 dd (15.0, 10.0)	36.2, CH ₂	2.08 dd (14.0, 12.5)	35.5, CH ₂
11 β	2.13 dd (14.0, 3.0)		2.69 dd (14.5, 5.5)		2.24 dd (14.0, 3.5)	
12	5.60 dd (12.0, 3.0)	71.1, CH	5.93 dd (10.0, 5.5)	72.3, CH	5.25 dd (12.5, 3.5)	69.8, CH
13		124.8, C		125.4, C		124.4, C
14	6.43 t (1.0) ^a	108.3, CH	6.42 dd (2.0, 1.0)	108.2, CH	6.36 dd (1.5, 1.0)	108.4, CH
15	7.42 t (2.0)	143.8, CH	7.43 t (2.0)	143.9, CH	7.37 t (1.5)	143.6, CH
16	7.48 s a	139.7, CH	7.47 m	139.5, CH	7.41m	139.7, CH
17		171.1, C		170.3, C		173.3, C
18		174.0, C		172.9, C		176.3, C
19-Pro R	4.96 s a	72.3, CH ₂	4.93 d (18.0)	71.9, CH ₂	5.45 dt (17.0, 1.5)	74.8, CH ₂
19-Pro S	4.69 d (17.0)		4.75 dd (18.0, 2.0)		4.57 dd (17.0, 2.5)	
20	1.38 s	25.7, CH ₃	1.40 s	25.8, CH ₃	1.39 s	16.0, CH ₃

^a Señal sobrepuesta

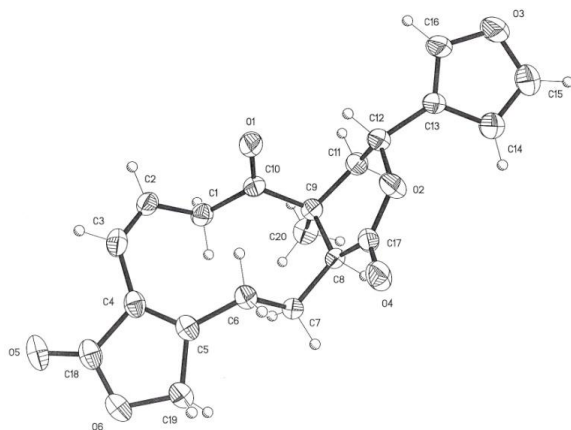


Figura 60. Diagrama ORTEP del compuesto **24**.

El compuesto **26** se aisló como un sólido cristalino incoloro. Su espectro de masas HRMS-FAB⁺ dió como resultado un ión pseudomolecular [M+H]⁺ a m/z 357.1331 que corresponde a una fórmula C₂₀H₂₀O₆. En su espectro en el IR se observaron bandas características para un grupo hidroxilo, una γ y una δ -lactonas, además un furano. En el espectro de RMN de ¹H se observaron señales que confirmaron la presencia de los grupos funcionales evidentes en el espectro en el IR. El espectro de RMN de ¹³C mostró 20 señales, de las cuales en el espectro DEPT se observaron señales para un metilo, cuatro metilenos y siete metinos.

En el espectro de RMN de ¹H de **26** se observaron dos señales con desplazamiento característico de protones vinílicos a δ_H 6.23 (1H, ddd, $J = 11.0, 7.0, 2.0$ Hz) y 5.99 (1H, dd, $J = 11.0, 6.5$ Hz) tentativamente asignadas a H-2 y H-1, respectivamente. En el espectro COSY (Figura 61), la señal de H-1 presentó acoplamiento con una señal a δ_H 3.62 (1H, dd, $J = 6.5, 2.0$ Hz, H-10); la señal de H-2 también mostró una correlación con la señal base de alcohol a δ_H 5.11 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-3). En el espectro HMBC (Figura 61) la señal de H-3 presentó con C-1 (δ 130.9, CH), C-2 (δ 133.5, CH), C-4 (δ 126.3, C) y C-5 (δ 160.6, C). El desplazamiento para las señales de los carbonos 4 y 5 determinó la presencia de una doble ligadura entre ambos carbonos, esto es indicativo de un 5,10-*seco*-clerodano. Adicionalmente, en el mismo espectro HMBC (Figura 61), la señal de H-10 presentó correlaciones heteronucleares con C-1, C-2, C-7 (δ 23.5, CH₂), C-8 (δ 32.6, C), C-9 (δ 29.0, C), C-17 (δ 173.3, C) y C-20 (δ 16.0, CH₃). Las correlaciones de H-10 con C-7 y C-17 sólo son posibles si **26** posee un ciclopropano entre los carbonos 8, 9 y 10. La presencia de una correlación entre H-1 y C-8 da soporte a esta suposición.

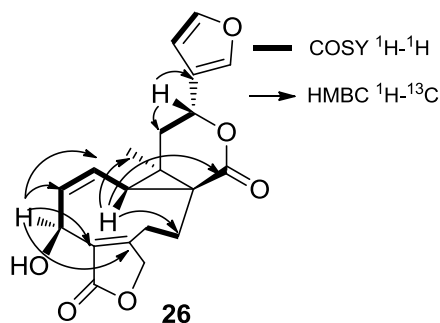


Figura 61. Correlaciones COSY y HMBC observadas para **26**.

En el espectro NOESY de **26** se observaron interacciones de H-10 con H-12 β ; de H₃-20 con H-1 y H-7 β . Esto indica que existe una relación *syn* de H₂-7 con H₃-20 y una relación antiperiplanar de H-10 con H₃-20. El valor de las constantes de acoplamiento de H-12 ($J_{11\alpha-12} = 12.5$ y $J_{11\beta-12} = 3.5$ Hz) indicaron que la estereoquímica en C-12 es igual a la de los productos **23** y **24**. La estereoquímica propuesta para **26** se confirmó por difracción de rayos-X de monocristal (Figura 62). Además, es importante hacer mención que la estructura de **26** posee un sistema anular 9/3 y representa el primer caso de un clerodano modificado con esta estructura.

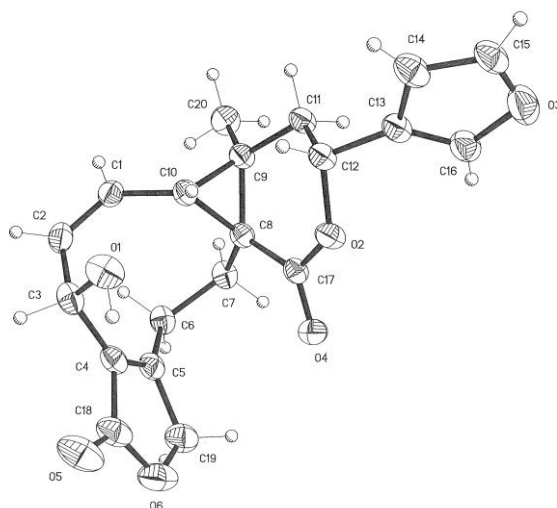


Figura 62. Diagrama ORTEP de **26**.

El compuesto **25** se aisló como un sólido amorfo de color blanco. En su espectro de masas obtenido por MS-ESI⁺ se observó un ión pseudomolecular [M+Na]⁺ a m/z 363 (C₂₀H₂₀O₅). La estructura de este componente se determinó por comparación de sus datos espectroscópicos de RMN ¹H y ¹³C con los reportados para la linearolactona (Figura 63), aislada de *Salvia lineata*.⁴⁷ Sin embargo, el valor de la rotación óptica de **25** ($[\alpha]_D = 105.9^\circ$, CDCl₃, c 0.17) no correspondió con el reportado para la linalocatona (Exp: $[\alpha]_D = -117.8$, CDCl₃, c 0.24; Lit: $[\alpha]_D = -68.9^\circ$, MeOH, c 0.19) también hubo

pequeñas diferencias en los valores de δ_H y δ_C en algunas señales de **25** con respecto a la linearolactona, las más notables son las señales de H₂-6 y H₂-11. En RMN de ¹³C también se observaron diferencias de desplazamiento en C-2, C-4, C-10 y C-11 de **25** con respecto a la linearolactona (Tabla 9).

El valor de las constantes de acoplamiento de H-12 ($J_{11\alpha-12} = 12.0$ y $J_{11\beta-12} = 3.5$ Hz) en **25** son indicativos de una disposición α -ecuatorial del anillo de furano. La estereoquímica relativa de **25** se determinó a partir de las correlaciones observadas en el espectro NOESY (Figura 63). La interacción de H-12 β con H-8 indicó que estos protones están del mismo lado de la molécula, esto sólo es posible si la δ -lactona tiene una conformación de bote y la δ -lactona posee una fusión *cis*. La interacción de H-19_{Pro-R} con H-8 indica que el metileno en C-19 tiene una orientación β ; de la misma forma, la correlación de H-19_{Pro-S} con H-10 determinó que la fusión de la decalina en **25** es *cis*- β . De acuerdo a lo anterior se estableció que **25**, presenta una decalina *cis*- β y una δ -lactona *cis*-fusionada, y que en la linearolactona la decalina es *cis*- α y la δ -lactona *trans*-fusionada (Figura 64).

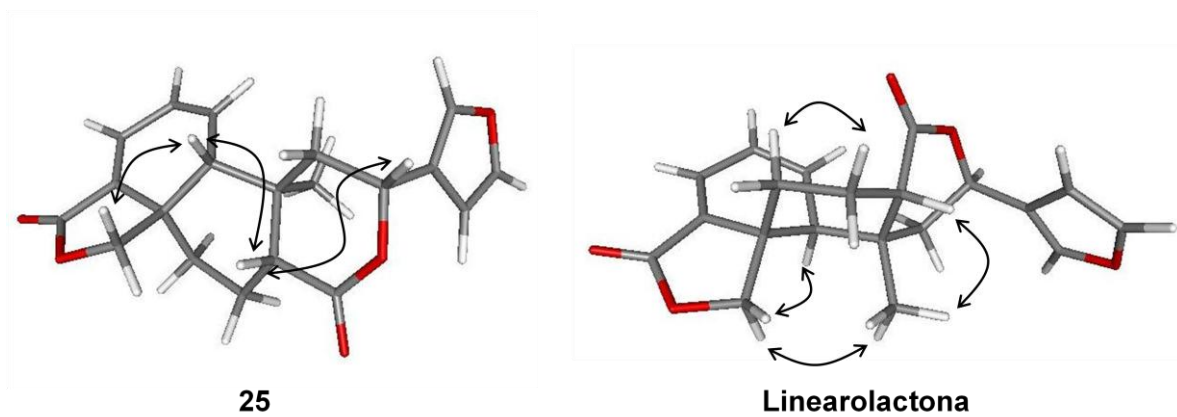


Figura 63. Correlaciones NOE observadas para **25** y linearolactona.

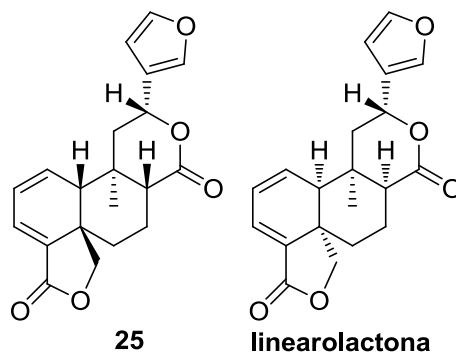


Figura 64. Diferencias estructurales entre **25** y la linearolactona.

El compuesto **27** se aisló como un sólido cristalino incoloro, su espectro de HRMS-FAB⁺ mostró un ión pseudomolecular [M+H]⁺ a m/z 357.1348, congruente con la fórmula C₂₀H₂₀O₆. Los espectros de RMN de ¹H y ¹³C de **27** presentaron una estrecha similitud con los espectros de la linearolactona (Figura 64). La diferencia entre estos dos compuestos radica en el desplazamiento de las señales asignadas a H-1, H₂-11 y H-12 (Tabla 9). En el espectro de RMN de ¹³C se observaron diferencias en el desplazamiento de las señales asignadas a C-1, C-2, C-6, C-10 y C-11. La diferencia estructural de **27** con respecto a la linearolactona se resolvió por la correlación observada en el espectro HMBC de una señal base de oxígeno a δ 74.3 (C, C-10) que no esta presente en la linearolactona con señales de los protones a δ 6.37 (1H, dd, $J = 9.5, 5.0$ Hz, H-1), 4.64 (1H, dd, $J = 8.5, 2.0$ Hz, H-19_{Pro-S}), 4.36 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-19_{Pro-R}), 2.96 (1H, dd, $J = 16.0, 7.5$ Hz, H-11 β), 2.62 (1H, dt, $J = 4.5, 2.0$ Hz, H-8), 1.99 (1H, dd, $J = 16.0, 1.0$ Hz, H-11 α) y 1.24 (3H, s, H₃-20). Estas correlaciones determinaron que **27** posee en su estructura un grupo hidroxilo en C-10.

Las interacciones observadas en el espectro NOESY establecen la estereoquímica relativa de **27** (Figura 65). Así, las señales de H-16 y H-14 que presentaron acoplamiento con la señal de H₃-20, indican que el anillo de furano tiene una disposición α -ecuatorial. La correlación de H-8 con H₃-20 establece que ambos protones están del mismo lado y por tanto **27** posee una δ -lactona *cis*-fusionada. Las correlaciones de los protones H₂-19 con H₃-20 (asumiendo que C-20 es α) determinaron una orientación α de este metileno. Finalmente, la orientación del OH-10 se determinó como β dada su correlación con H-6 β .

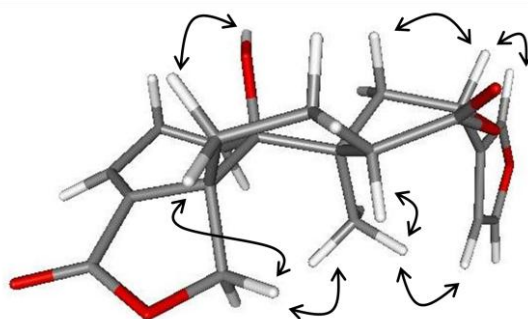


Figura 65. Correlaciones NOE observadas para **27**.

Tabla 9. Desplazamientos de RMN de ^1H (500 MHz) y ^{13}C (125 MHz) para la **linearolactona** y los compuestos **25** y **27**, determinados en CDCl_3 .

Posición	Linearolactona		25		27	
	δ_{H} (mult, <i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, <i>J</i> en Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult, <i>J</i> en Hz)	δ_{C}
1	6.23 dd (10.0, 2.5)	133.2, CH	5.87 dd (5.5, 3.0)	131.0, CH	6.37 dd (9.5, 5.0) ^a	126.2, CH
2	6.33 ddd (10.0, 5.0, 3.5)	126.1, CH	6.19 ddd (8.5, 5.5, 3.0)	122.6, CH	6.42 m ^a	134.3, CH
3	6.95 d (5.0)	128.7, CH	6.85 d (5.0)	128.1, CH	7.01 d (5.0)	127.2, CH
4		132.8, C		128.9, C		134.9, C
5		39.8, C		40.3, C		47.5, C
6 α	1.26 m ^a	21.9, CH ₂	1.77 dtd (12.5, 9.5, 2.5)	23.5, CH ₂	1.72 m ^a	27.4, CH ₂
6 β	1.89 dddd (14.0, 14.0, 4.5, 2.0)		1.66 dd (14.5, 9.0)		1.72 m ^a	
7 α	1.59 tt (14.0, 5.0)	16.7, CH ₂	2.08 m ^a	16.1, CH ₂	2.07 ddd (14.0, 4.5, 2.0)	16.4, CH ₂
7 β	2.09 m ^a		2.08 m ^a		1.66 m ^a	
8	2.46 d a (5.0)	41.2, CH	2.30 dd (6.5, 2.0)	41.9, CH	2.62 dt (4.5, 2.0)	43.3, CH
9		35.2, C		34.4, C		39.9, C
10	2.37 s a	50.0, CH	2.86 br s	52.5, CH		74.3, C
11 α	2.73 dd (16.0, 8.0)	36.4, CH ₂	2.04 dd (14.5, 12.0) ^a	47.9, CH ₂	1.99 dd (16.0, 1.0)	33.2, CH ₂
11 β	2.14 dd (16.0, 0.5)		2.22 dd (14.5, 3.5)		2.96 dd (16.0, 7.5)	
12	5.75 d a (8.0)	70.9, CH	5.37 dd (12.0, 3.5)	70.1, CH	5.62 dd (7.5, 1.0)	71.3, CH
13		127.1, C		123.3, C		126.9, C
14	6.42 dd (1.5, 0.5)	108.6, CH	6.43 dd (2.0, 1.0)	108.4, CH	6.41 d (3.0) ^a	108.6, CH
15	7.47 t (2.0)	144.5, CH	7.44 t (2.0)	143.9, CH	7.46 t (2.0)	144.5, CH
16	7.40 m	138.6, CH	7.49 m	139.8, CH	7.39 dd (3.0, 2.0)	138.7, CH
17		172.3, C		172.7, C		172.6, C
18		168.7, C		169.0, C		168.1, C
19- <i>Pro R</i>	4.54 d (9.0)	76.9, CH ₂	4.47 d (8.0)	78.6, CH ₂	4.36 d (8.5)	70.6, CH ₂
19- <i>Pro S</i>	4.05 dd (9.0, 2.0)		3.95 dd (8.0, 2.0)		4.64 dd (8.5, 2.0)	
20	1.28 s ^a	31.3, CH ₃	1.16 s	25.0, CH ₃	1.24 s	26.4, CH ₃

^a Señal sobrepuesta.

6.4 Evaluación de la actividad biológica

6.4.1 Actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón

En este modelo se evaluó la actividad antiinflamatoria *in vivo* de los compuestos **1-9**, **11**, **14**, **16-19**, **24**, **26** y **27** a una concentración de 1 $\mu\text{mol/oreja}$ (Figura 66). Los resultados de esta evaluación se muestran en la Tabla 10. Entre los compuestos evaluados, el compuesto **4** presentó actividad antiinflamatoria significativa (87.19 % inhibición del edema).

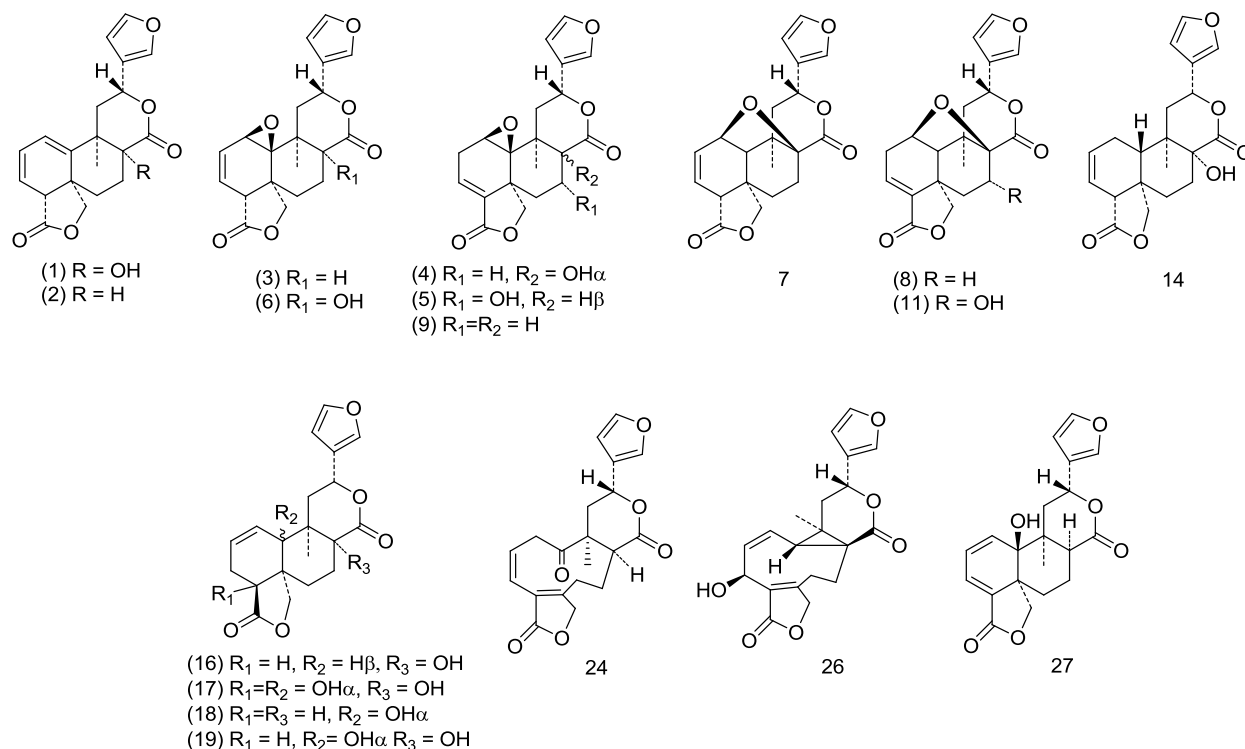


Figura 66. Estructuras de los *neo*-clerodanos evaluados en el modelo antiinflamatorio de TPA.

Posteriormente se determinó el valor de IC₅₀ del compuesto **4** en este modelo y resultó ser comparable con la indometacina (0.24 $\mu\text{mol/oreja}$), usada como compuesto de referencia: Adicionalmente, se evaluó la actividad antiinflamatoria de **4** en el modelo de inhibición de la producción de nitritos por la Oxidasa Sintasa Inducible (*iNOS*) y en el modelo de edema inducido con carragenina en rata.

Tabla 10. Inhibición de la inflamación en el modelo de edema inducido con TPA en oreja de ratón

Compuesto	% Inhibición ^a	Compuesto	% Inhibición ^a
1	32.67	11	33.62
2	43.06	14	23.56
3	51.75	16	31.39
4	87.19	17	39.84
5	57.01	18	9.09
6	58.15	19	51.11
7	31.59	24	19.96
8	49.57	26	39.46
9	53.29	27	54.26
Indometacina	78.76	-	-

^a Evaluación a 1 $\mu\text{mol/oreja}$

Los resultados de inhibición en la producción de nitritos (Tabla 11) indicaron que **4** inhibe la producción de nitritos en un porcentaje comparable con la aminoguanidina, un inhibidor de la *i*NOS que se usó como referencia.

Tabla 11. Inhibición en la producción de nitritos por parte de *i*NOS.

Compuesto	Concentración (mM)	Nitrito		Viabilidad celular (%)
		mM	Inhibición (%)	
Control		29.81 ± 1.7		
4	3.1	25.46 ± 1.0	14.57	98
	10	24.51 ± 1.1	17.75	96
	31	21.49 ± 0.5	27.89	96
	100	19.00 ± 0.2	36.24	92
Aminoguanidina	3.1	25.00 ± 1.1	12.47	97
	10	24.04 ± 0.7	15.8	96
	31	22.73 ± 0.6	20.4	97
	100	19.97 ± 0.2	30.11	97

Para confirmar la actividad antiinflamatoria del compuesto **4**, este se evaluó en el modelo de carragenina, en este modelo las ratas presentaron signos de intoxicación y murieron en un lapso de 24 hs. posteriores a la administración del compuesto a las dos diferentes dosis (100 y 31 mg/kg_{pc}) por vía intraperitoneal.

6.4.2 Actividad antiprotozoaria

Esta prueba se realizó contra dos protozoarios causantes de cuadros diarreicos, estos son: *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. En este modelo se evaluaron los compuestos 1-6, 9, 14-19, 21, 24, 26, 27, linearolactona (neoclerodano) y metronidazol usados como referencia (Figura 67).

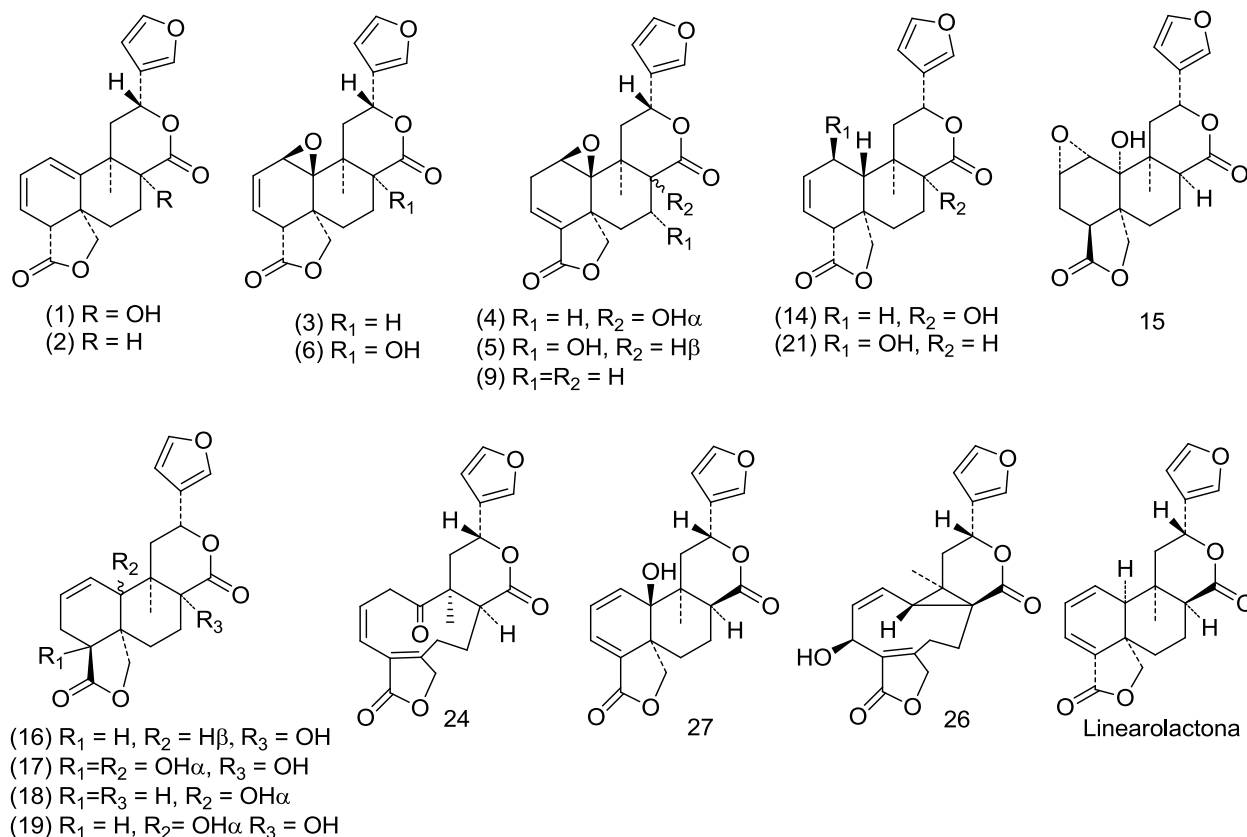


Figura 67. Estructuras de los diterpenos evaluados contra *E. histolytica* y *G. lamblia*.

Todos los compuestos evaluados presentaron menor actividad antiprotozoaria (IC₅₀) que la linearolactona, un diterpeno con actividad antiprotozoaria previamente aislado de *Salvia polystachya*.⁸⁴ Los valores de inhibición (Tabla 12) sugieren que la fusión *cis* de la decalina, el dieno 1,3 y la δ -lactona con fusión *trans* son requerimientos estructurales para que los diterpenos evaluados produzcan un efecto antiprotozoario.

Tabla 12. Resultados de actividad antiprotozoaria.

Compuesto	IC ₅₀ (µg/mL)	
	<i>E. histolytica</i>	<i>G. lamblia</i>
1	68.3	74.3
2	71.6	82.1
3	67.3	81.2
4	71.2	86.4
5	76.1	81.6
6	68.9	82.5
9	59.7	66.4
14	56.5	42.2
15	56.8	63.3
16	63.3	73.1
17	76.3	82.1
18	84.7	94.8
19	79.7	85.8
21	57.4	71.7
24	61.6	57.5
26	64.9	71.7
27	66.7	76.7
Linearolactona	7.8	9.6
Metronidazol	0.04	0.21

6.4.3 Actividad citotóxica

En esta prueba se determinó la inhibición del crecimiento celular de seis líneas de carcinomas humanos a una concentración de 50 µM. Los resultados de estas determinaciones (Tabla 13) no fueron muy alentadores y de los compuestos evaluados (Figura 66), sólo el compuesto **5** presentó un buen porcentaje de inhibición del crecimiento celular. Posteriormente se determinó la IC₅₀ de **5** en las líneas celulares donde se observó inhibición significativa. Los resultados de la determinación anterior mostraron que la citotoxicidad de **5** (U251 IC₅₀ = 41.86 ± 1.4 µM y SKLU-1 IC₅₀ = 38.92 ± 4.1 µM) es baja comparada contra otros compuestos con citotoxicidad conocida como la camptotecina (U251 IC₅₀ = 0.024 ± 0.005 y SKLU-1 IC₅₀ = 0.15 ± 0.009 µM).

Tabla 13. Inhibición del crecimiento celular en líneas de carcinomas humanos.

Compuesto	% de inhibición del crecimiento por línea celular (50 μ M).					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
1	sa	27.25	12.56	32.34	9.72	24.47
2	sa	41.26	24.95	46.54	12.73	30.62
3	29.60	sa	52.62	44.57	12.64	29.14
4	38.89	23.84	21.83	54.16	31.81	54.19
5	100.00	71.00	76.51	91.62	81.69	100.00
6	30.47	sa	44.76	36.14	sa	35.69
7	19.3	18.8	5.6	sa	16.5	29.4
8	37.8	2.3	sa	sa	2.8	14.5
9	sa	16.79	sa	sa	16.56	sa
11	43.4	21.4	13.4	3.3	8.8	33.1
14	0.96	16.77	sa	7.94	16.5	sa
16	10.77	12.98	40.06	sa	19.43	17.73
17	16.58	7.76	32.59	sa	11.64	5.97
18	6.46	sa	29.29	sa	sa	4.67
19	2.92	3.44	25.27	sa	10.14	21.34
24	sa	sa	sa	sa	sa	sa
26	sa	sa	sa	sa	sa	sa
27	sa	sa	sa	sa	sa	sa

^a Evaluación a 50 μ M del compuesto de prueba.

7. CONCLUSIONES

En el presente estudio se aislaron 24 diterpenos y una flavona. Entre los diterpenos aislados, 17 de ellos poseen estructura de *neo*-clerodano que no han sido descritas en la literatura y uno de los diterpenos posee un esqueleto carbonado novedoso que contiene un anillo de ciclopropano en su estructura.

Del extracto de las partes aéreas de *Salvia herbacea* Benth. obtenido con acetona se aislaron la 1(10)-dehidrosalviarina y ocho *neo*-clerodanos más a los que se les dio el nombre de tehaninas A-H (**7**, **8**, **11**, **1**, **6**, **5**, **4** y **9**). Se corrigió la estructura de la 1 α ,10 α -epoxisalviarina y se estableció una nueva estructura, que es la 1 β ,10 β -epoxisalviarina (**3**); adicionalmente se completó la asignación de señales en RMN de ^1H y ^{13}C para la 1(10)-dehidrosalviarina (**2**).

El estudio químico del extracto de acetona obtenido de las hojas de *Salvia shannoni* J. D. Smith condujo al aislamiento de la 8-hidroxisalviarina (**14**) como componente mayoritario, esplenólida A (**21**), infuscatina (**17**), tehanina G (**4**) y seis clerodanos más con estructuras no reportadas (**15**, **16**, **18-20** y **22**).

El estudio de la composición química del extracto de acetona de las hojas y flores de *Salvia microphylla* Kunt condujo al aislamiento de cinco diterpenos, dos de ellos *neo*-clerodanos identificados como un diastereoisómero de la linearolactona (**25**) y la 10 β -hidroxilinearolactona (**27**); dos 5,10-*seco*-*neo*-clerodanos (**23** y **24**), uno de ellos identificados como un diastereoisómero de la cardiofilidina (**24**); y un diterpeno con un nuevo esqueleto carbocíclico (**26**).

Si bien dos de las especies estudiadas no tienen uso en la medicina tradicional de México, los resultados de actividad biológica mostraron que el compuesto **4** (tehanina G) presentó actividad antiinflamatoria comparable con indometacina y el compuesto **5** (tehanina F) presentó actividad citotóxica marginal contra líneas celulares de carcinoma de sistema nervioso central y de pulmón. Los resultados de la actividad antiprotozoaria de los compuestos evaluados resultaron moderados.

8. REFERENCIAS

- 1) Saklani, A.; Kutty, S. K.; Plant-derived compounds in clinical trials; *Drug. Discov. Today* **2008**, *13*, 161-171.
- 2) Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M.; Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037.
- 3) Heinrich, M.; Economic Botany of American Labiatae. *Advances in Labiatae Science* **1992**, 475-478.
- 4) Rodríguez-Hann, L.; Cárdenas, J.; Comparative chemotaxonomy in Labiatae; *Current topics in Phytochemistry* **1999**, *2*, 91-102.
- 5) Imanshahidi, M.; Hosseinzadeh, H.; The pharmacological effects of *Salvia* species on the nervous central system; *Phytother. Res.* **2006**, *20*, 427-437.
- 6) Aguilar, A.; Camacho, J. R.; Chino, S.; Jáquez, P.; López, M. E.; Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social; *Instituto Mexicano del Seguro Social* **1994**, México D. F., México, 107-110.
- 7) Flora medicinal Indígena de México, *Instituto Nacional Indigenista* **1994**, Vol. 1, Tomo 3; 1228, 1292.
- 8) Flora medicinal Indígena de México, *Instituto Nacional Indigenista* **1994**, Vol. 1, Tomo 2; 672, 696, 738, 762, 928.
- 9) Zhiyun, Y.; Gong, X.; Pan, Y.; Cytological study of six *Salvia* species (Lamiaceae) from the Hengduanshan Mountains region of China; *Caryologia* **2008**, *57*, 360-366.
- 10) Domínguez-Vázquez, G.; Berlin, B.; Castro-Ramírez, A.; Estrada-Lugo, E.; Revisión de la diversidad y patrones de distribución de Labiatae en Chiapas; *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* **2002**, *73*, 39-80.
- 11) Bentham, G.; Labiatae in Bentham, G. and Hooker J.D.; *Genera Plantarum* **1986**, *2*, 1160-1223, Reveal and Co. London.
- 12) Epling, C.; A revision of *Salvia*, Subgenus *Calospatha*; *Verlag des Repertoriums*, **1939**, Berlin, Germany, 101-102, 210, 277-279.
- 13) Bao-Qing, W.; *Salvia miltiorrhiza*: Chemical and pharmacological review of a medicinal plant; *J. Med. Plant. Res.* **2010**, *4*, 2813-2820.
- 14) Dong, Y.; Morris-Natschke, S. L.; Kuo-Hsiung, L.; Biosynthesis, total synthesis and antitumor activity of thansinones and their analogs as potential therapeutic agents; *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 529-542.
- 15) Prisinzano, T. E.; Natural products as tools for neuroscience: Discovery and development of novel agents to treat drug abuse; *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 581-587.
- 16) Clebsch, B.; The new book of *Salvias*, *Timber Press* **2003**, 269.

- 17) Dewick, P. M.; Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd Edition, Chapter 4, 2009, John Wiley & Sons.
- 18) Yinrong, L.; Yeap, F. L.; Polyphenolics in *Salvia*-a review; *Phytochemistry* **2002**, *59*, 117-140.
- 19) Kamatou, G. P. P.; Makunga, N. P.; Ramogola, W. P. N.; Viljoen, A. M.; South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry; *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *119*, 664-672.
- 20) González, A. G.; Grillo, T. A.; Aguiar, Z. E.; Luis, J. G.; Calle, J.; Rivera, A.; Minor sesquiterpene lactones from *Salvia palaefolia*; *phytochemistry* **1991**, *10*, 3462-3464.
- 21) Ali, M. S.; Ahmed, W.; Armstrong, A. F.; Ibrahim, S. A.; Ahmed, S.; Parvez, M.; Guaianolides from *Salvia nubicola* (Lamiaceae); *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 1235-1238.
- 22) Ali, M. S.; Ibrahim, S. A.; Ahmed, S.; Lobkovsky, E.; Guaiane sesquiterpene lactones from *Salvia nubicola* (Lamiaceae); *Chemistry & Biodiversity* **2004**, *4*, 98-104.
- 23) Yong, L.; Chong, L.; Jiang-Gong, S.; Yang-Ping, S.; Two new sesquiterpenes from *Salvia roborowskii* MAXIM; *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92*, 335-338.
- 24) Rodríguez-Hahn, L.; Esquivel, B.; Cárdenas, J.; New terpenoid skeletons of clerodanic origin from Mexican *Salvia* species; *Trends in Organic Chemistry* **1992**, *3*, 99-111.
- 25) Rodríguez-Hahn, L.; Esquivel, B.; Cárdenas, J.; Abietane and icetexane diterpenoids from Mexican *Salvia* Sp.; *Secondary metabolites from Mexican plants: Chemistry and biological properties* **1996**, 19-29.
- 26) González, A. G.; Herrera, J. R.; Luis, J. G.; Ravelo, A. G.; Rodríguez, M. L.; Ferro, E.; Cardiophyllidin, a *seco-ent-neo-clerodane* diterpenoid from *Salvia cardiophylla*; *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 363-366.
- 27) Esquivel, B.; Tello, R.; Sánchez, A. A.; Unsaturated diterpenoids with a novel carbocyclic skeleton from *Salvia xalapensis*; *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 787-790.
- 28) Jaime-Vasconcelos, M. A.; Frontana-Urbe, B. A.; Morales-Serna, J. A.; Salmón, M.; Cárdenas, J.; Salvioccidentalín, a diterpenoid with a rearranged *neo-clerodane* skeleton from *Salvia occidentalis*; *Molecules* **2011**, *16*, 9109-9115.
- 29) Aoyagi, Y.; Yamazaki, A.; Nakatzugawa, C.; Fukaya, H.; Takeya, K.; Kawauchi, S.; Izumi, H.; Salvileucalin B, a novel diterpenoid with an unprecedented rearranged neoclerodane skeleton from *Salvia leucantha* Cav.; *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4429-4432.
- 30) Aoyagi, Y.; Yamazaki, A.; Kato, R.; Tobe, F.; Fukaya, H.; Nishikawa, T.; Nakahashi, A.; Miura, N.; Monde, K.; Takeya, K.; Salvileucalin C, a novel rearranged neoclerodane diterpene from *Salvia leucantha*; *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1851-1853.

- 31) Moghaddam, F. M.; Farimani, M. M.; Seirafi, M.; Taheri, S.; Khavasi, H. R.; Sendker, J.; Proksch, P.; Wray, V.; Edrada, R. A.; Sesterterpenoids and other constituents from *Salvia sahendica*; *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1601-1605.
- 32) Dal Piaz, F.; Vassallo, A.; Lepore, L.; Tosco, A.; Bader, A.; De Tommasi, N.; Sesterterpenes as tubulin tyrosine ligase inhibitors. First insight of structure activity relationships and discovery of new lead; *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3814-3828.
- 33) Moghaddam, F. M.; Amiri, R.; Alam, M.; Hossain, M. B.; Van Der Helm, D.; Structure and absolute stereochemistry of Salvimirzacolide, a new sesterterpene from *Salvia mirzayanii*; *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 279-281.
- 34) Cioffi, G.; Bader, A.; Malafronte, A.; Dal Piaz, F.; De Tommasi, N.; Secondary metabolites from the aerial parts of *Salvia palaestina* Benthams; *Phytochemistry* **2008**, *69*, 1005-1012.
- 35) Ulubelen, A.; Topcu, G.; Sönmez, U.; Eris, C.; Özgen, U.; Norsesterterpenes and diterpenes from the aerial parts of *Salvia limbata*; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 431-434.
- 36) Topcu, G.; Ulubelen, A.; Tham, T. C. M.; Tao-Che, C.; Sesterterpenes and other constituents of *Salvia yosgadensis*; *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1089-1092.
- 37) Ahmad, Z.; Fatima, I.; Mehmood, S.; Ifzal, R.; Malik, A.; Afza, N.; New epoxydammarane triterpenes from *Salvia santolinifolia*; *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 73-78.
- 38) Rauter, A. P.; Branco, I.; Lopes, R. G.; Justino, J.; Silva, F. V. M.; Noronha, J. P.; Cabrita, E. J.; Brouard, I.; Bermejo, J.; A new lupene triterpenetriol and anticholinesterase activity of *Salvia sclareoides*; *Fitoterapia* **2007**, *78*, 474-481.
- 39) Pu, L.; Pan, H.; Rui-Xue, D.; Ru, L.; Li, Y.; Wei-Ping, Y.; Triterpenoids from the flowers of *Salvia miltiorrhiza*; *Helv. Chim. Acta* **2011**, *94*, 136-141.
- 40) Wang, Y.; Song, D.; Li, Z.; Tao, Y.; Hailong, Z.; Yuehu, P.; Jing, Y.; Hua, H.; Triterpenoids isolated from the aerial parts of *Salvia chinensis*; *Phytochemistry Lett.* **2009**, *2*, 81-84.
- 41) Farimani, M. M.; Bahadori, M. B.; Taheri, S.; Ebrahimi, S. M.; Zimmermann, S.; Brun, R.; Amin, G.; Hamburger, M.; Triterpenoids with rare carbon skeletons from *Salvia hydrangea*: Antiprotozoal activity and absolute configurations; *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2200-2205.
- 42) Farimani, M. M.; Taheri, S.; Ebrahimi, S. M.; Bahadori, M. B.; Khavasi, H. R.; Zimmermann, S.; Brun, R.; Hamburger, M.; Hydrangenone, a new isoprenoid with an unprecedented skeleton from *Salvia hydrangea*; *Org. Lett.* **2012**, *14*, 166-169.
- 43) Ortega, A.; Maldonado, E.; Jankowski, C. K.; Van Calsteren, M. R.; Díaz, E.; Structural elucidation of infuscatin, a diterpenoid from *Salvia infuscata*; *Phytochem. Anal.* **1994**, *5*, 302-304.
- 44) Esquivel, B.; Cárdenas, J.; Rodríguez-Hahn, L.; The diterpenoid constituents of *Salvia fulgens* and *Salvia microphylla*; *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 738-740.

- 45) Esquivel, B.; Cárdenas, J.; Toscano, A.; Soriano-García, M.; Rodríguez-Hahn, L.; Structure of salvigenólido, a novel diterpenoid with a rearranged *neo*-clerodane skeleton from *Salvia fulgens*; *Tetrahedron* **1985**, *41*, 3213-3217.
- 46) Narukawa, Y.; Fukui, M.; Hatano, K.; Takeda, T.; Four new diterpenoids from *Salvia fulgens* Cav.; *J. Nat. Med.* **2006**, *60*, 58-63.
- 47) Esquivel, B.; Cárdenas, J.; Ramamoorthy, T. P.; Rodríguez-Hahn, L.; Clerodane diterpenoids of *Salvia lineata*; *Phytochemistry* **1986**, *25*, 2381-2384.
- 48) Soriano-García, M.; Esquivel, B.; Toscano, R. A.; Rodríguez-Hahn, L.; Structure and stereochemistry of (8*S*,12*R*)-*cis*-clerodane-1,3,13(16),14-tetraene-15,16-epoxy-12(17);18,19-diolide (linearolactone), a diterpene; *Acta Cryst.* **1987**, *43*, 1565-1567.
- 49) Martínez, M. A.; Medicinal plants used in a totonac community of Sierra Norte de Puebla: Tuzamapan de Galeana, Puebla, México; *J. Ethnopharmacol.* **1984**, *11*, 203-211.
- 50) Esquivel, B.; Martínez, N. S.; Cárdenas, J.; Ramamoorthy, T. P.; Rodríguez-Hahn, L.; The pimarane-type diterpenoids of *Salvia microphylla* var. *Neurepia*; *Planta Medica* **1989**, *55*, 62-63.
- 51) Aydogmus, Z.; Yesilyurt, V.; Topcu, G.; Constituents of *Salvia microphylla*; *Nat. Prod. Res.* **2006**, *8*, 775-781.
- 52) Roth, B. L.; Baner, K.; Westkaemper, R.; Siebert, D.; Rice, K. C.; Steinberg, S.; Ernsberger, P.; Rothman, R. B.; Salvinorin A: A potent naturally occurring nonnitrogenous κ opioid selective agonist; *PNAS* **2002**, *99*, 11934-11939.
- 53) Ortega, A.; Blount, J. F.; Manchand, P. S.; Salvinorin, a new *trans*-neoclerodane diterpene from *Salvia divinorum* (Labiatae); *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1982**, *10*, 2505-2508.
- 54) Cunningham, C. W.; Rothman, R. B.; Prisinzano, T. E.; Neuropharmacology of the naturally occurring κ -opioid hallucinogen salvinorin A; *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 316-347.
- 55) Prisinzano, T. E.; Natural products as tools for neuroscience: Discovery and development of novel agents to treat drug abuse; *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 581-587.
- 56) Morani, A. S.; Kivell, B.; Prisinzano, T. E.; Schenk, S.; Effect of kappa-opioid receptor agonists U69593, U50488H, spiradoline and salvinorin A on cocaine-induced drug-seeking in rats; *Pharmacol. Biochem. & Behav.* **2009**, *94*, 244-249.
- 57) Prisinzano, T. E.; Rothman, R. B.; Salvinorin A analogs as probes in opioid pharmacology; *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1732-1743.
- 58) Fontana, G.; Savona, G.; Rodríguez, B.; Dersch, C. M.; Rothman, R. B.; Prisinzano, T. E.; Synthetic studies of neoclerodane diterpenoids from *Salvia splendens* and evaluation of opioid receptor affinity; *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10041-10048.

- 59) Fontana, G.; Savona, G.; Rodríguez, B.; Dersch, C. M.; Rothman, R. B.; Prisinzano, T. E.; Synthetic studies of neoclerodane diterpenoids from *Salvia splendens*: Oxidative modifications of ring A; *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1708-1715.
- 60) Li, Y.; Husbands, S. M.; Mahon, F. M.; Traynor, J. R.; Rowan, M. G.; Isolation and chemical modification of clerodane diterpenoids from *Salvia* species as potential agonists at the κ -opioid receptor; *Chem. & Biodiv.* **2007**, *4*, 1586-1593.
- 61) Mullin C. A.; González-Coloma, A.; Gutiérrez, C.; Reina, M.; Eichenseer, H.; Hollister, B.; Chyb, S.; Antifeedant effects of some novel terpenoids on chysomelidae beetles: comparisons with alkaloids on an alkaloid-adapted and nonadapted species; *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 1851-1866.
- 62) López-Olguín, J.; De la Torre, M. C.; Ortego, F.; Castañera, P.; Rodríguez, B.; Structure-activity relationships of natural and synthetic *neo*-clerodane diterpenes from *Teucrium* against Colorado potato beetle larvae; *Phytochemistry* **1999**, *50*, 749-753.
- 63) González-Coloma, A.; Gutiérrez, C.; Miguel del Corral, J. M.; Gordaliza, M.; De la Puente, M. L.; San Feliciano, A.; Structure- and species dependent insecticidal effects of *neo*-clerodane diterpenes; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 3677-3681.
- 64) Belles, X.; Camps, F.; Coll, J.; Piulachs, M. L.; Insect antifeedant activity of clerodane diterpenoids against larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera); *J. Chem. Ecol.* **1985**, *11*, 1439-1445.
- 65) Rosselli, S.; Maggio, A.; Piozzi, F.; Simmonds, M. S. J.; Bruno, M.; Extremely potent antifeedant *neo*-clerodane derivatives of scutecyprol A; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7867-7871.
- 66) Enriz, R. D.; Baldoni, H. A.; Zamora, M. A.; Jáuregui, E. A.; Sosa, M. E.; Tonn, C. E.; Luco, J. M.; Gordaliza, M.; Structure-Antifeedant activity relationships of clerodane diterpenoids. Comparative study with withanolides and azadirachtin; *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1384-1392.
- 67) Cifuentes, D. A.; Borkowski, E. J.; Sosa, M. E.; Gianello, J. C.; Giordano, O. S.; Tonn, C. E.; Clerodane diterpenes from *Baccharis sagittalis*: insect antifeedant activity; *Phytochemistry* **2002**, *61*, 899-905.
- 68) Juan Hikawczuk, V. E.; López Verrilli, M. A.; Borkowski, E. J.; Sosa, M. E.; Giordano, O. S.; Saad, J. R.; Tonn, C. E.; Antifeedant activity of *neo*-clerodane diterpenes from *Baccharis flabellata* Hook & Arn. var. *flabellata* toward *Tribolium castaneum* Herbst: structure activity relationships; *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 813-819.
- 69) Klein Gebbinck, E. A.; Jansen, B. J. M.; De Groot, A.; Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds; *Phytochemistry* **2002**, *61*, 737-770.
- 70) Starks C. M.; Williams, R. B.; Goering, M. G.; O'Neil-Johnson, M.; Norma, V. L.; Jin-Feng, H.; Garo, E.; Hough, G. W.; Rice, S. M.; Eldridge, R. M.; Antibacterial clerodane diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*); *Phytochemistry* **2010**, *71*, 104-109.

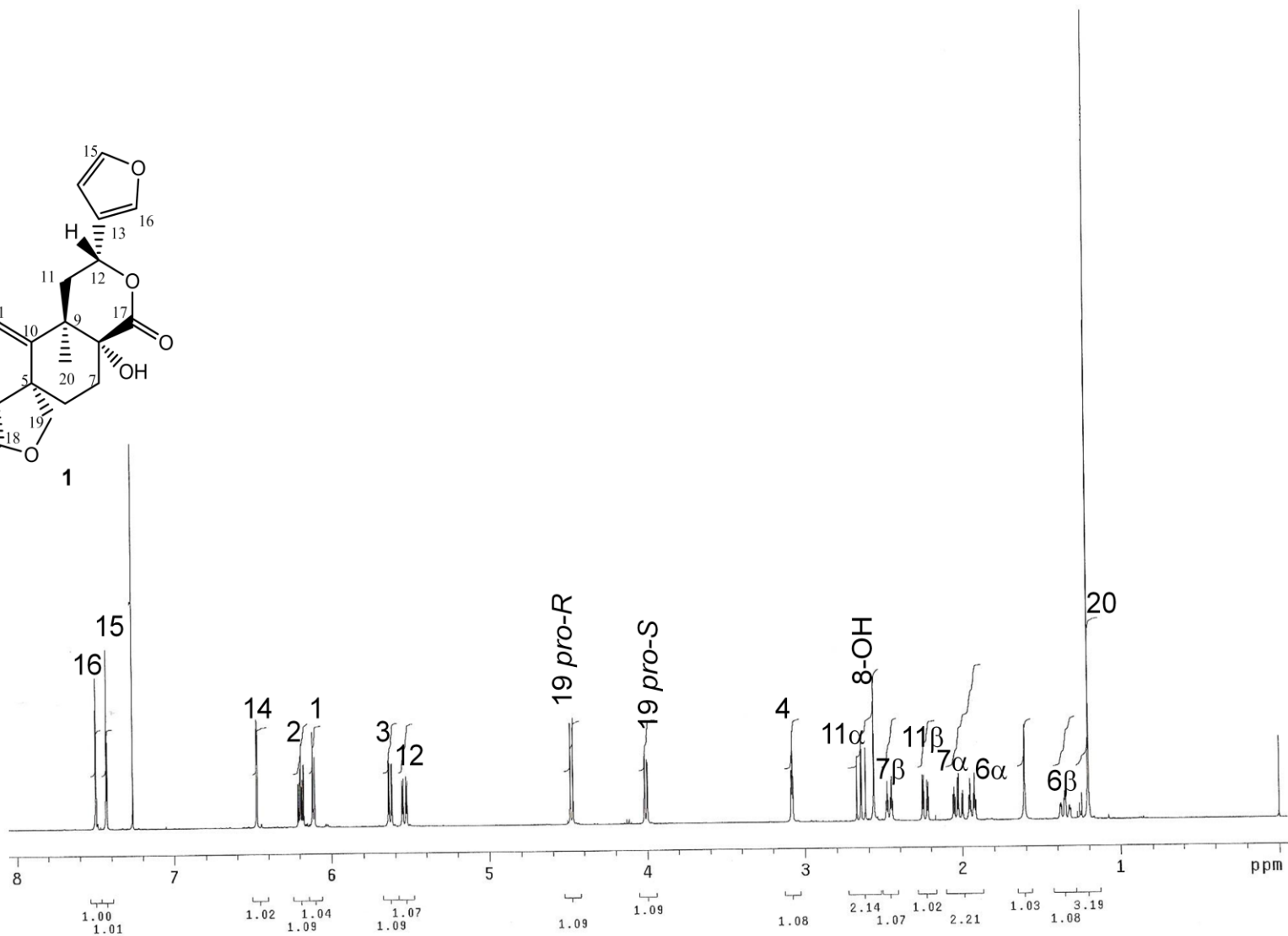
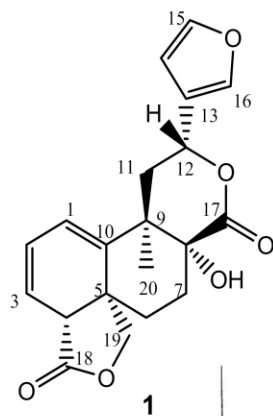
- 71) Urzúa, A.; Torres, R.; Mendoza, L.; Monache, D. L.; Antibacterial new clerodane diterpenes from the surface of *Haplopappus foliosus*; *Planta Med.* **2003**, *69*, 675-677.
- 72) Chahine, E. B.; Nornoo, A. O.; Ceftobiporle: The first broad-spectrum anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* beta-lactam; *J. Exp. Clin. Med.* **2011**, *3*, 9-16.
- 73) Auger, S.; Galleron, N.; Segurens, B.; Dossat, C.; Bolotin, A.; Wincker, P.; Sorkin, A.; Complete genome sequence of the highly hemolytic strain *Bacillus cereus* F837/76; *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 1630.
- 74) Ingraham, J. L.; Introducción a la microbiología, Vol. 2; Ed. Reverté, **1998**, 559-561.
- 75) Avelino, F.; Saldaña, Z.; Islam, S.; Monteiro-Neto, V.; Dall'Agnol, M.; Eslava, C.; Girón, J. A.; The majority of enteroaggregative *Escherichia coli* strains produce the *E. coli* common pilus when adhering to cultured epithelial cells; *Int. J. Med. Microbiol.* **2010**, *300*, 440-448.
- 76) Hichem-Ben, J.; Atef, C.; Amina, B.; Zine, M.; Structure-antibacterial activity relationships of secondary metabolites from *Ajuga pseudoiva* Rob. leaves; *Nat. Prod. Res.* **2006**, *20*, 299-304.
- 77) Teponno, R. B.; Tapandjou, A. L.; Gatsing, D.; Djoukeng, J. D.; Abour-Mansour, E.; Tabacchi, R.; Tane, P.; Stoekli-Evans, H.; Lontsi, E.; Bafoudiosbulbins A, and B, two anti-salmonellal clerodane diterpenoids from *Dioscorea bulbifera* L. var. *sativa*; *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1957-1963.
- 78) Harinantenaina, L.; Takahara, Y.; Nishizawa, T.; Kohchi, C.; Soma, G. I.; Asakawa, Y.; Chemical constituents of Malagasy Liverworts, Part V: Prenyl bibenzyls and clerodane diterpenoids with nitric oxide inhibitory activity from *Radula appressa* and *Thysananthus spathulistipus*; *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 1046-1049.
- 79) Li, W.; Huang, C.; Li, S.; Ma, F.; Li, Q.; Asada, Y.; Koike, K.; Clerodane diterpenoids from *Tinospora sagittata* (Oliv.) Gagnep; *Planta Med.* **2012**, *78*, 82-85.
- 80) Aviello, G.; Borrelli, F.; Guida, F.; Romano, B.; Lewellyn, K.; De Chiaro, M.; Luomgo, L.; Zjawiony, J. K.; Maione, S.; Izzo, A. A.; Capasso, R.; Ultrapotent effects of salvinorin A, a hallucinogenic compound from *Salvia divinorum*, on LPS-stimulated murine macrophages and its anti-inflammatory action in vivo; *J. Mol. Med.* **2011**, *89*, 891-902.
- 81) Simpson, B. S.; Claudie, D. J.; Gerber, J. P.; Pyke, S. M.; Wang, J.; McKinnon, R. A.; Semple, S. J.; In vivo activity of benzoyl ester clerodane diterpenoid derivatives from *Dodonea polyandra*; *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 650-657.
- 82) Singh, S.; Bharti, N.; Mohapatra, P. P.; Chemistry and Biology of synthetic and naturally occurring antiamebic agents; *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 1900-1947.
- 83) Prole, D. L.; Marrion, N. V.; Identification of putative potassium channel homologues in pathogenic protozoa; *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32264.

- 84) Calzada, F.; Yopez-Mulia, L.; Tapia-Contreras, A.; Bautista, E.; Maldonado, E.; Ortega, A.; Evaluation of the antiprotozoal activity of neo-clerodane type diterpenes from *Salvia polystachya* against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*; *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 662-665.
- 85) Jullian, V.; Bonduelle, C.; Valentin, A.; Acebey, L.; Duigou, A. G.; Prévost, M. F.; Sauvain, M.; New clerodane diterpenoids from *Laetia procera* (Poepp.) Eichler (Flacourtiaceae), with antiplasmodial and antileishmanial activities; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5065-5070.
- 86) Kanokmedhakul, S.; Kanokmedhakul, K.; Kanarsa, T.; Buayairaksa, M.; New bioactive clerodane diterpenoids from the bark of *Caesaria grewiifolia*; *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 183-188.
- 87) Sathe, M.; Kaushik, M. P.; Gomphostenins: Two new antimalarial compounds from the leaves of *Gomphostemma niveum*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1312-1314.
- 88) Sathe, M.; Ghorpade, R.; Srivastava, A. K.; Kaushik, M. P.; In vivo antimalarial evaluation of gomphostenins; *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *130*, 171-174.
- 89) Campos, M. C. O.; Salomao, K.; Castro-Pinto, D. B.; León, L. L.; Barbosa, H. S.; Aparecida, M.; Solange, M.; Castro, L.; *Croton cajucara* crude extract and isolated terpenes: Activity on *Trypanosoma cruzi*; *Parasitol. Res.* **2010**, *107*, 1193-1204.
- 90) Espíndola, L. S.; Vasconcelos-Júnior, J. R.; De Mesquita, M. L.; Marquié, P.; De Paula, J. E.; mambu, L.; Santana, J. M.; Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*; *Planta Med.* **2004**, *70*, 1093-1095.
- 91) Freiburghaus, F.; Steck, A.; Pfander, H.; Brun, R.; Bioassay-guided isolation of a diastereoisomer of kolavenol from *Entada abyssinica* active on *Trypanosoma brucei rhodansinse*; *J. Ethnopharmacol.* **1998**, *61*, 179-183.
- 92) Dong-Ming, H.; Ya-Ching, S.; Chi, W.; Yao-Ting, H.; Fan-Lu, K.; Che-Ming, T.; Jih-Hwa, G.; Investigation of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways of new clerodane diterpenoids in humane prostate cancer PC-3 cells; *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *503*, 17-24.
- 93) Oberlies N. H.; Burgess, J. P.; Navarro, H. A.; Pinos, R. E.; Fairchild, C. R.; Peterson, R. W.; Soejarto, D. D.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*; *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 95-99.
- 94) Kanokmedhakul, S.; Kanokmedhakul, K.; Kanarsa, T.; Cytotoxic clerodane diterpenoids from fruits of *Casearia grewiifolia*; *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1122-1126.
- 95) Sheng-Jun, D.; Jia-Yi, T.; Ke, L.; Yong-Tao, J.; Li, S.; neo-Clerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata* with cytotoxic activities; *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1326-1330.
- 96) Chin, Y. W.; Jones, W. P.; Mi, Q.; Rachman, I.; Riswan, S.; Kardono, L. B. S.; Chai, H. B.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Swanson, S. M.; Cassady, J. M.; Kinghorn, D. A.; Cytotoxic clerodane diterpenoids from the leaves of *Premna tomentosa*; *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1243-1248.

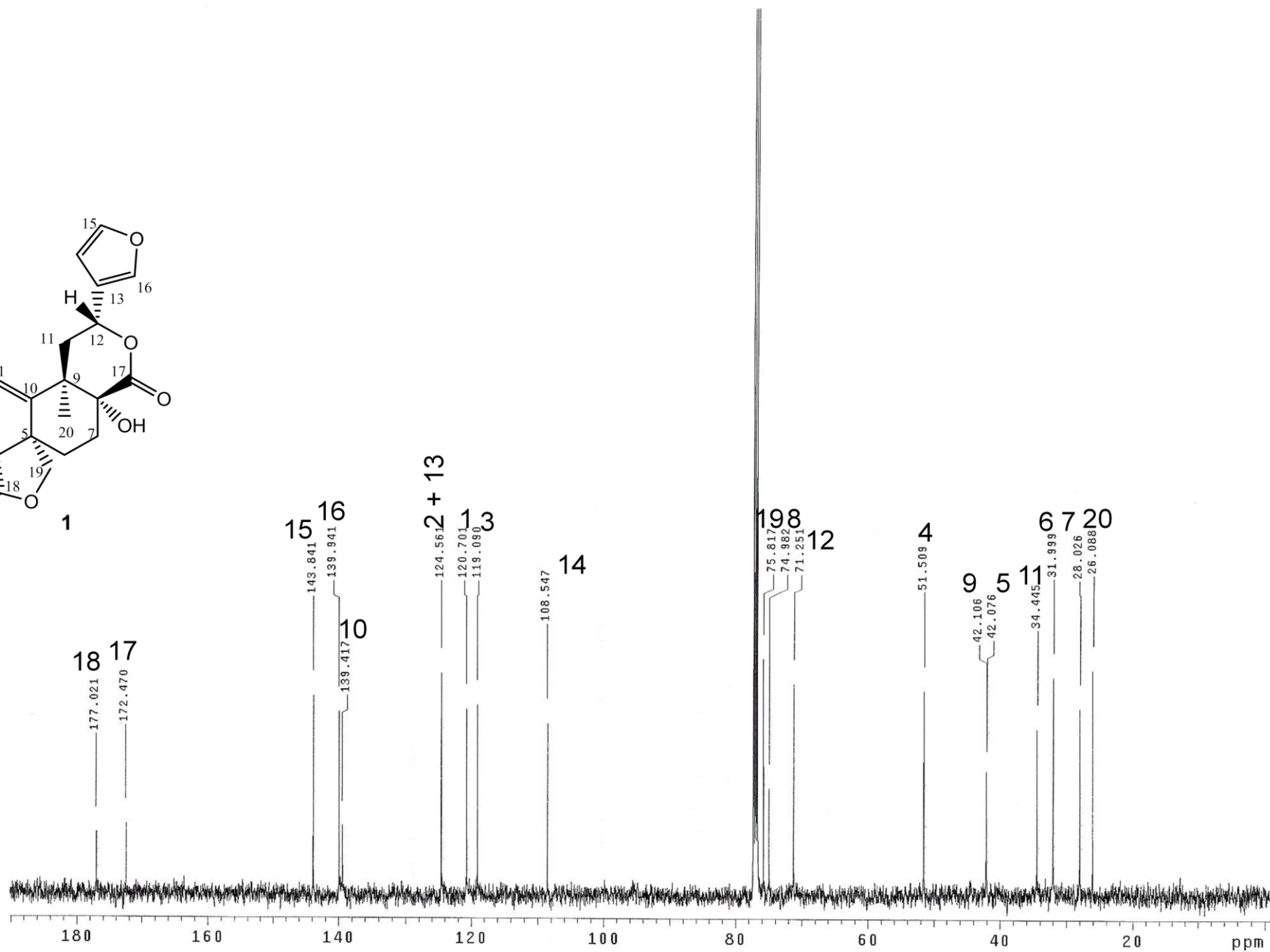
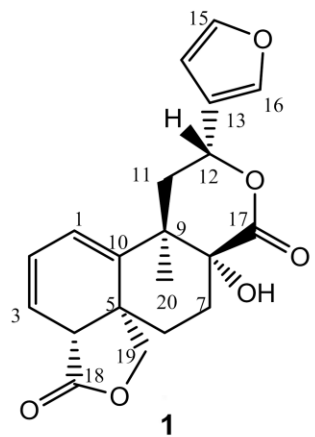
- 97) Miranda, R.; Ríos, H.; Delgado, F.; Castro, M.; Cogordán, A.; Salmón, M.; Characterization of a bentonitic clay and its application as catalyst in the preparation of benzyltoluenes and oligotoluenes; *Ap. Cat. A* **2003**, *244*, 217-233.
- 98) Nagao, T.; Abe, F.; Kinjo, J.; Okabe, H.; Antiproliferative constituents in plants 10. Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-activity relationship; *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 875-879.
- 99) Nieto, M.; Gallardo, O. V.; Rossomando, P. C.; Tonn, C. E.; 8-Hidroxyalviarin and 7,8-dehydrorhyacophiline, two new diterpenes from *Salvia reflexa*; *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 880-882.
- 100) Fontana, G.; Savona, G.; Rodríguez, B.; Complete ^1H and ^{13}C NMR assignments of clerodane diterpenoids of *Salvia splendens*; *Magn. Reson. Chem.* **2006**, *44*, 962-965.

Apéndice A

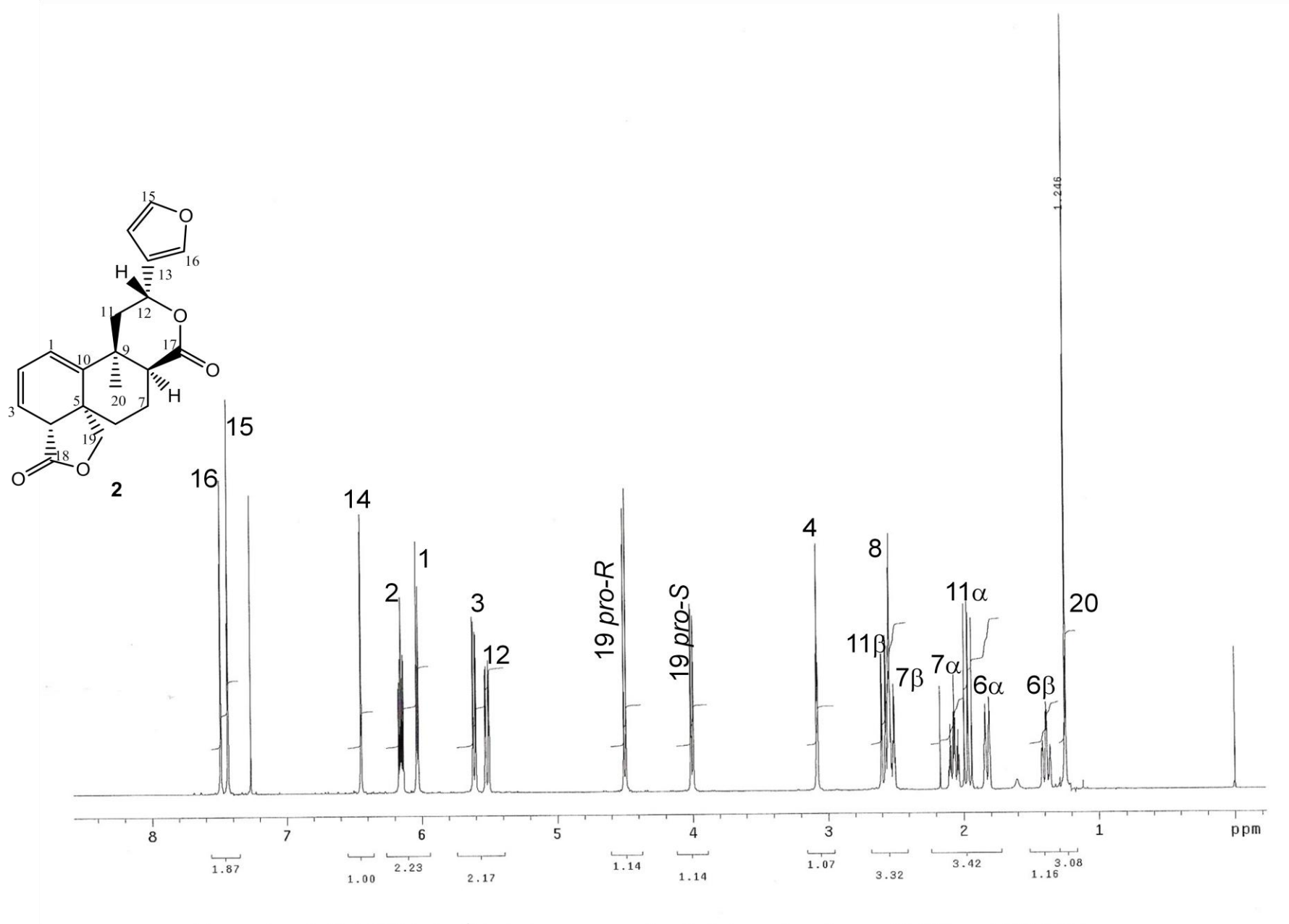
Espectros de RMN de los compuestos aislados de *Salvia herbacea*



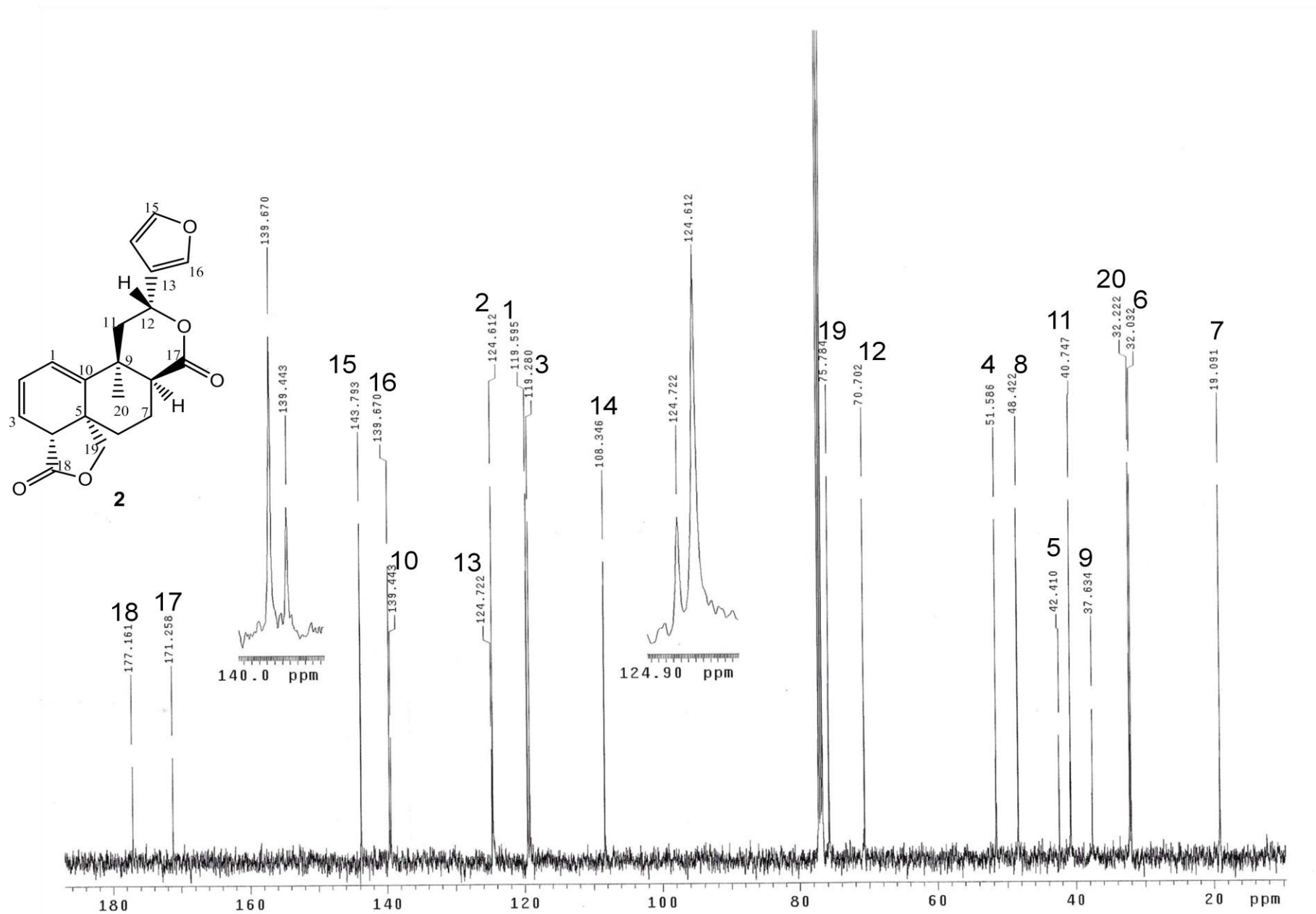
Espectro A-1: RMN de ¹H del compuesto **1** determinado en CDCl₃ a 500 MHz.



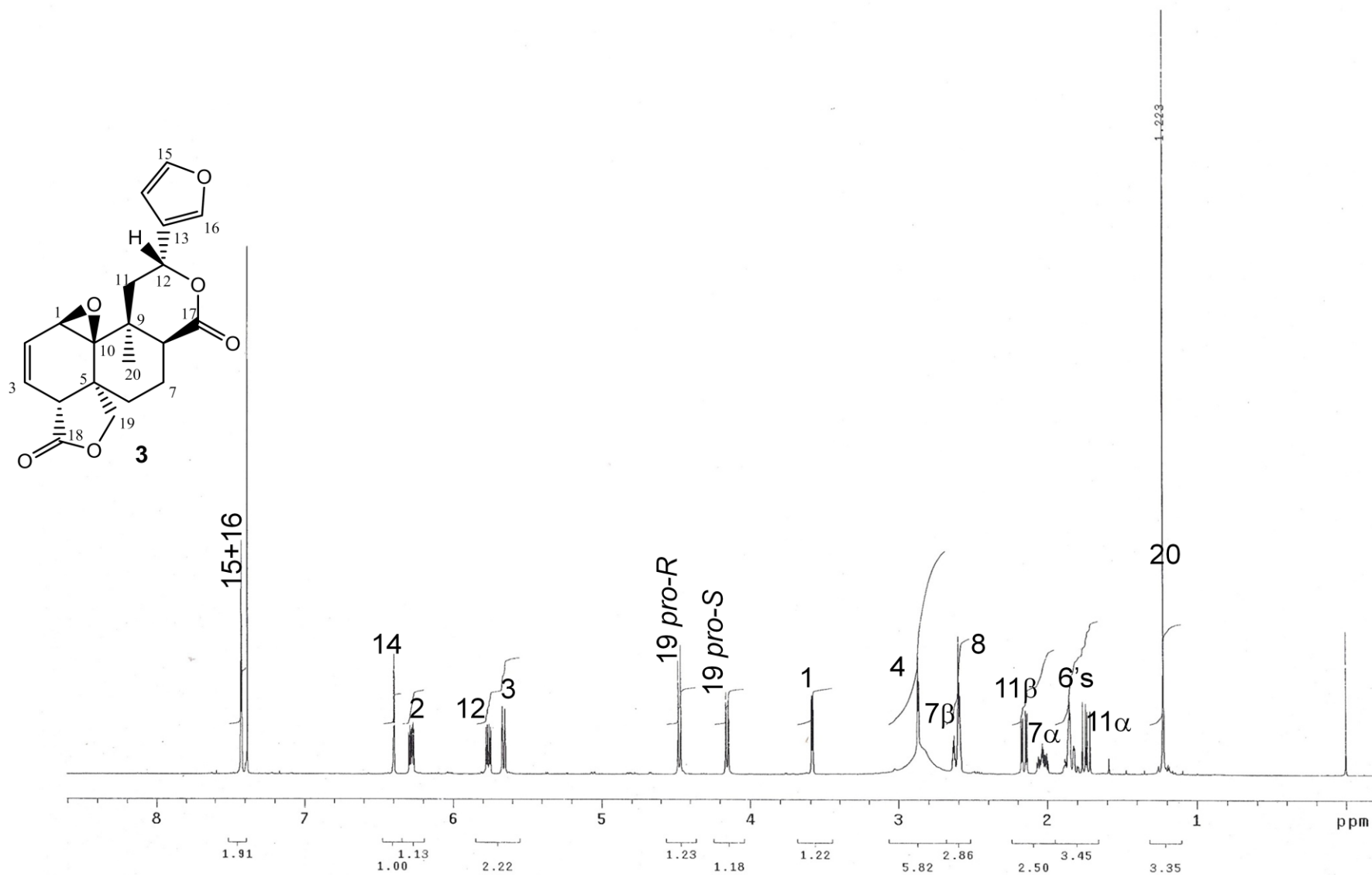
Espectro A-2: RMN de ^{13}C del compuesto **1** determinado en CDCl_3 a 125 MHz.



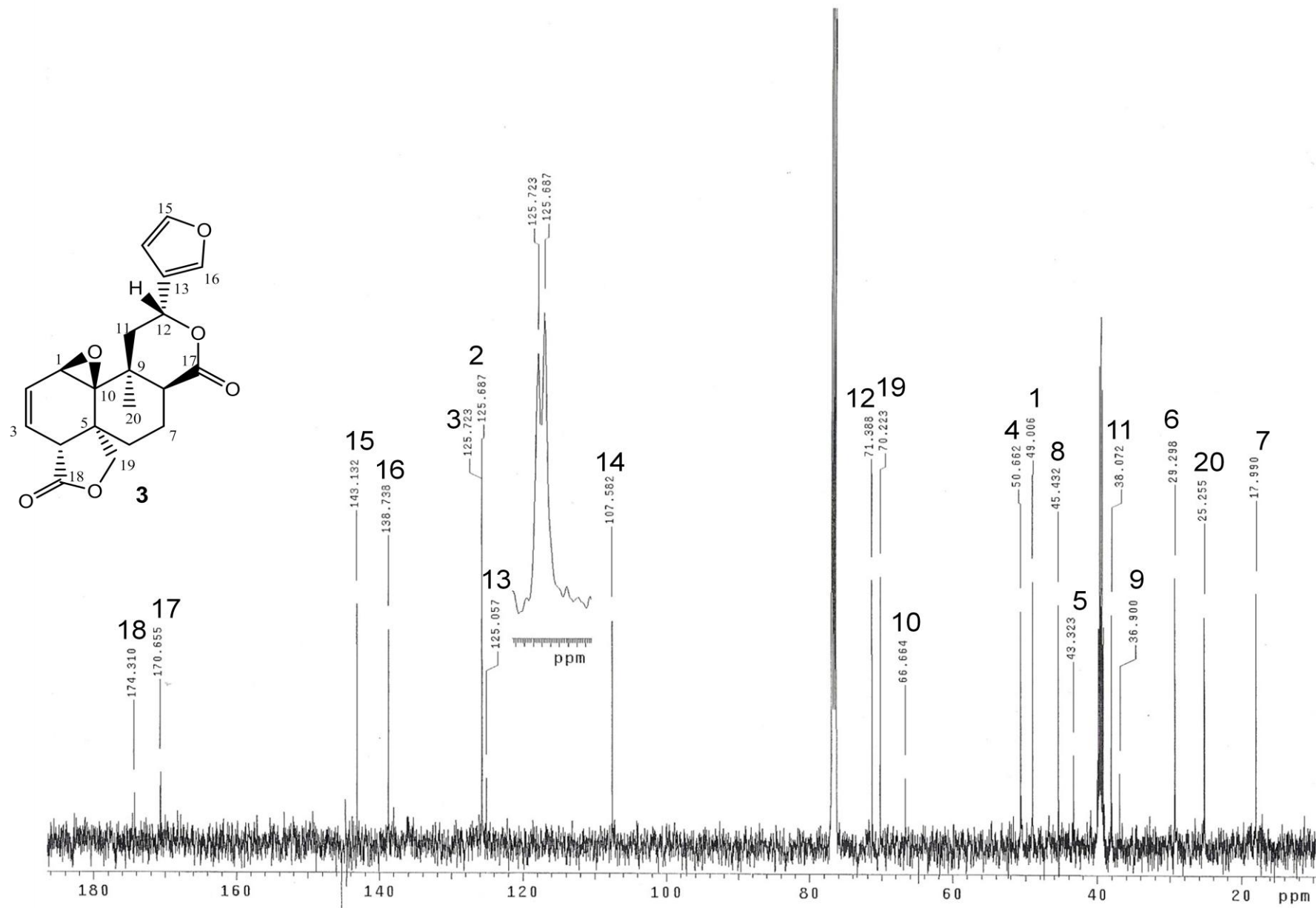
Espectro A-3: RMN de ^1H del compuesto **2** determinado en CDCl_3 a 500 MHz.



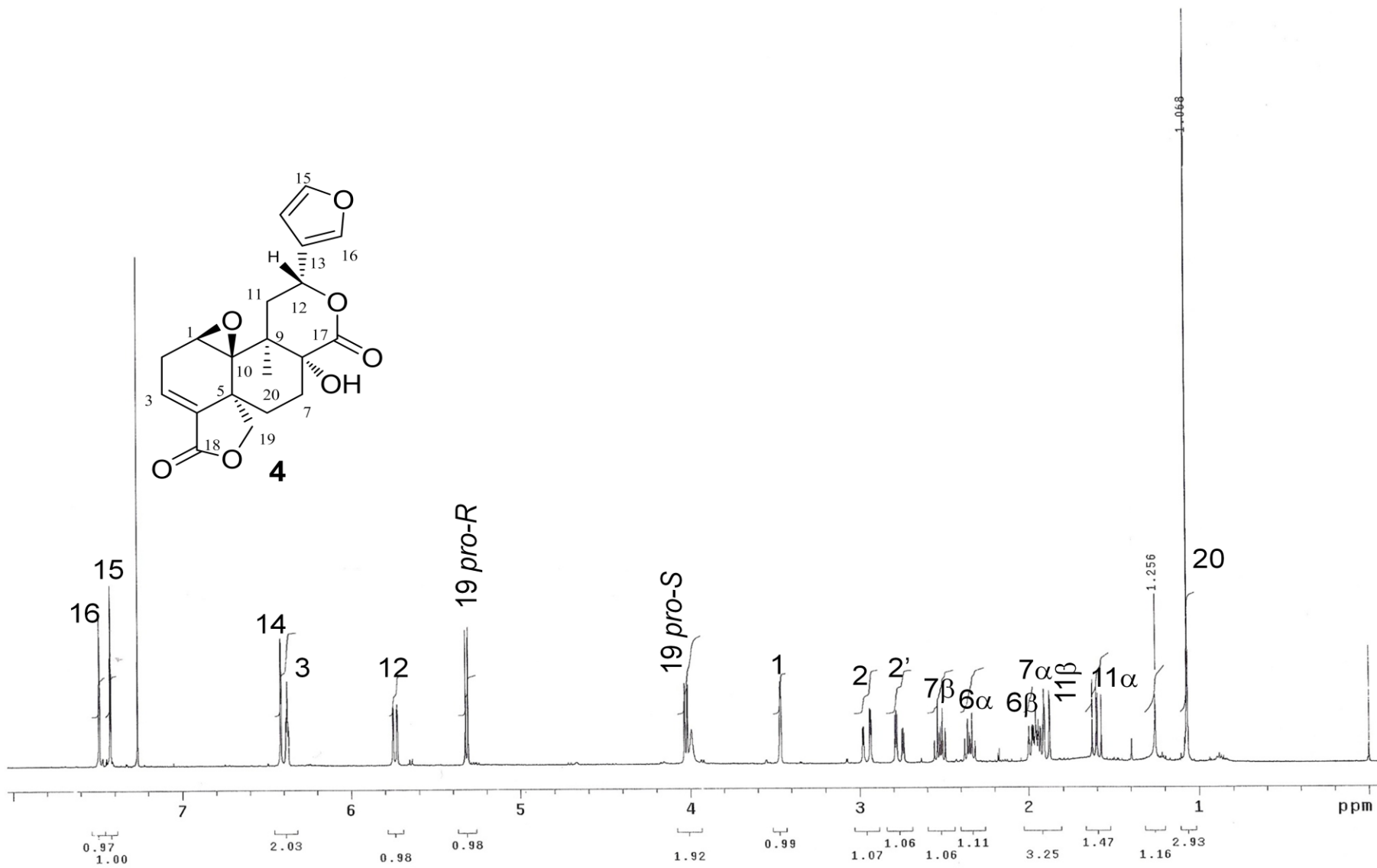
Espectro A-4: RMN de ¹³C del compuesto **2** determinado en CDCl₃ a 125 MHz.



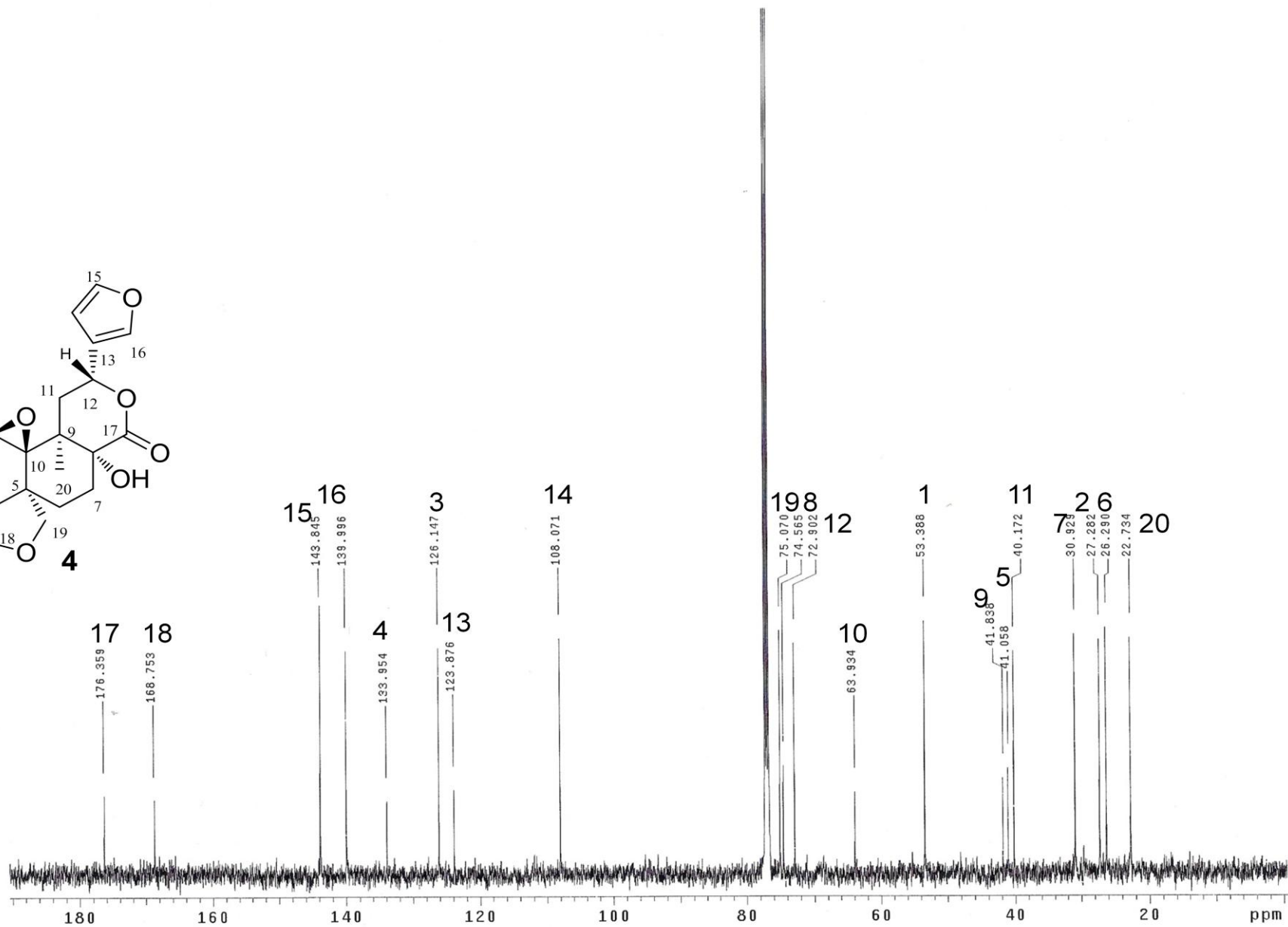
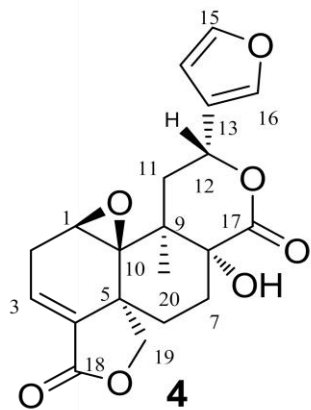
Espectro A-5: RMN de ¹H del compuesto **3** determinado en CDCl₃ a 300 MHz.



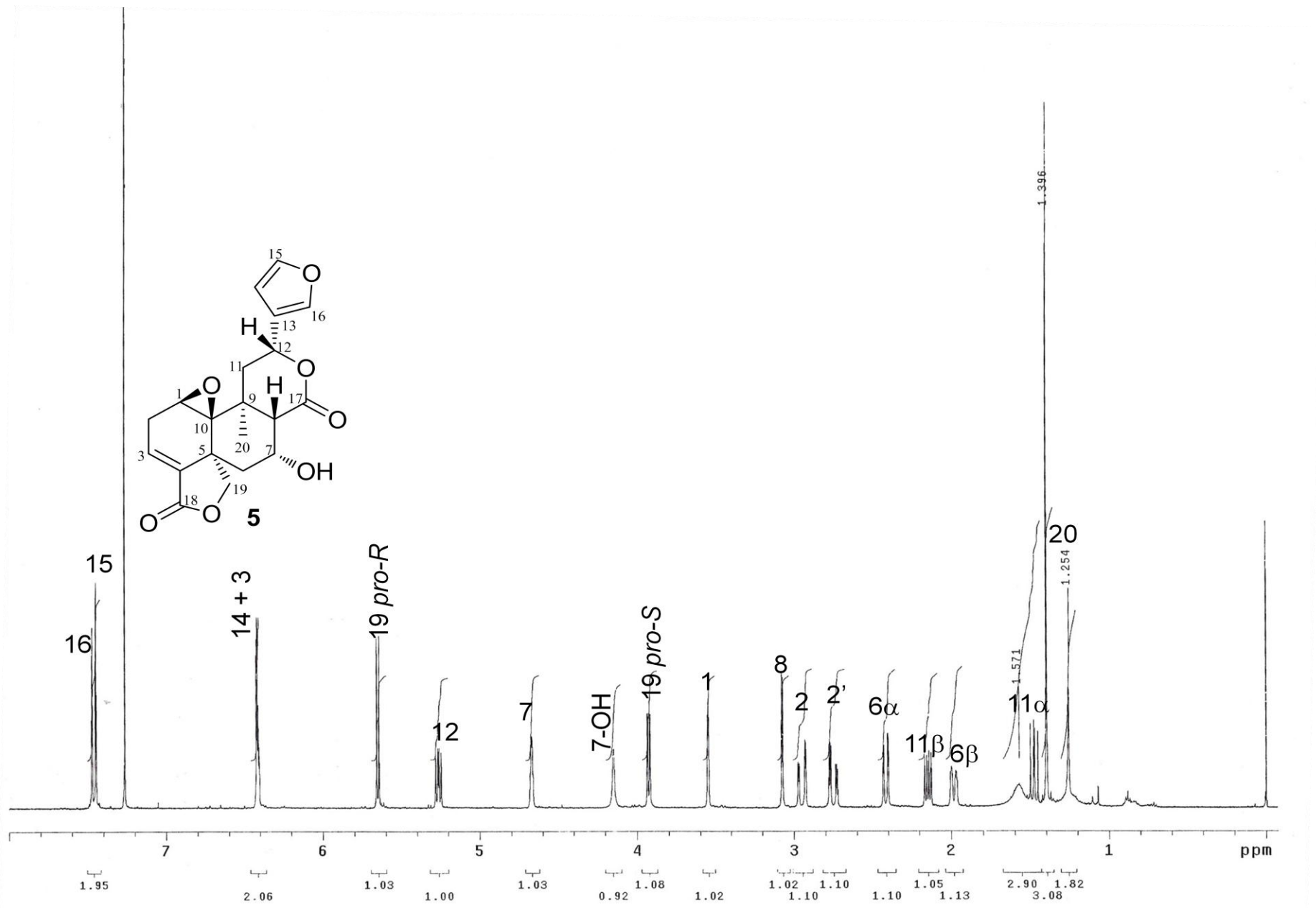
Espectro A-6: RMN de ^{13}C del compuesto **3** determinado en CDCl_3 a 75 MHz.



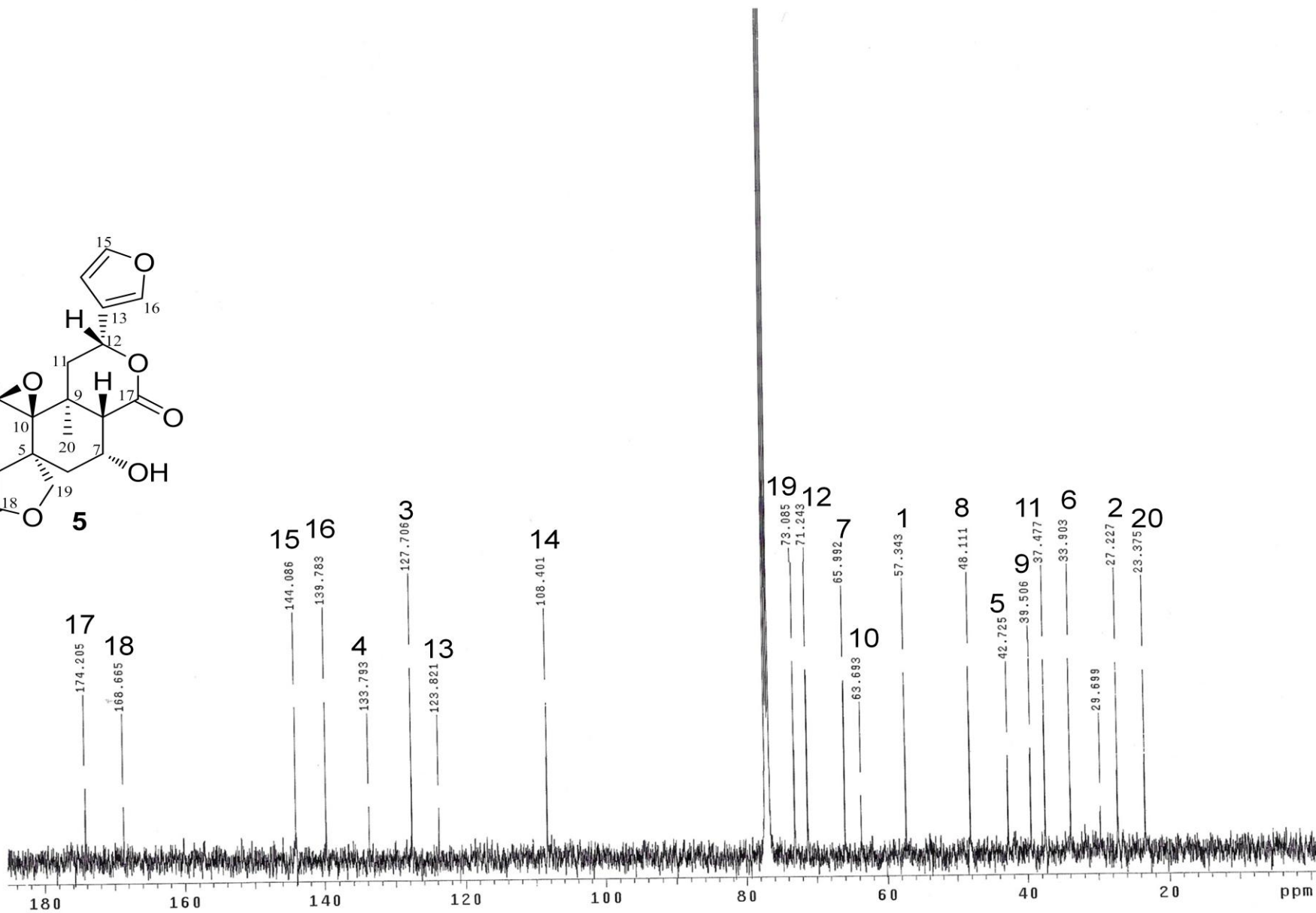
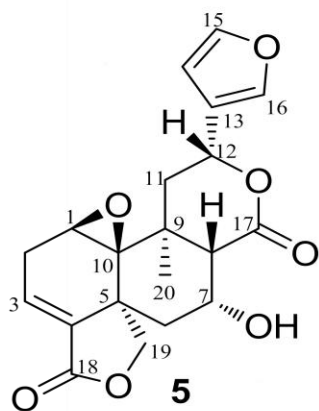
Espectro A-7: RMN de ¹H del compuesto **4** determinado en CDCl₃ a 500 MHz.



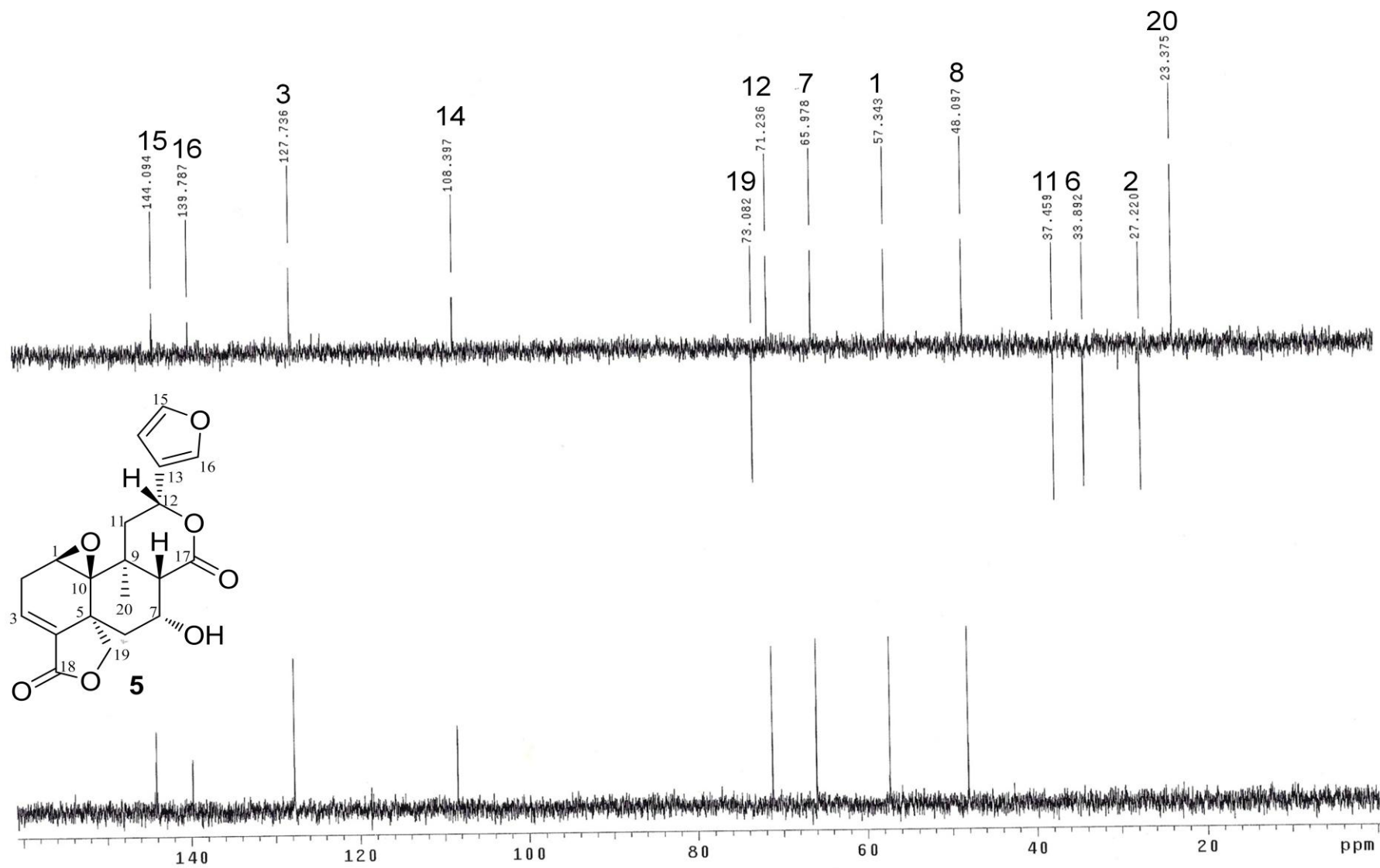
Espectro A-8: RMN de ^{13}C del compuesto **4** determinado en CDCl_3 a 125 MHz.



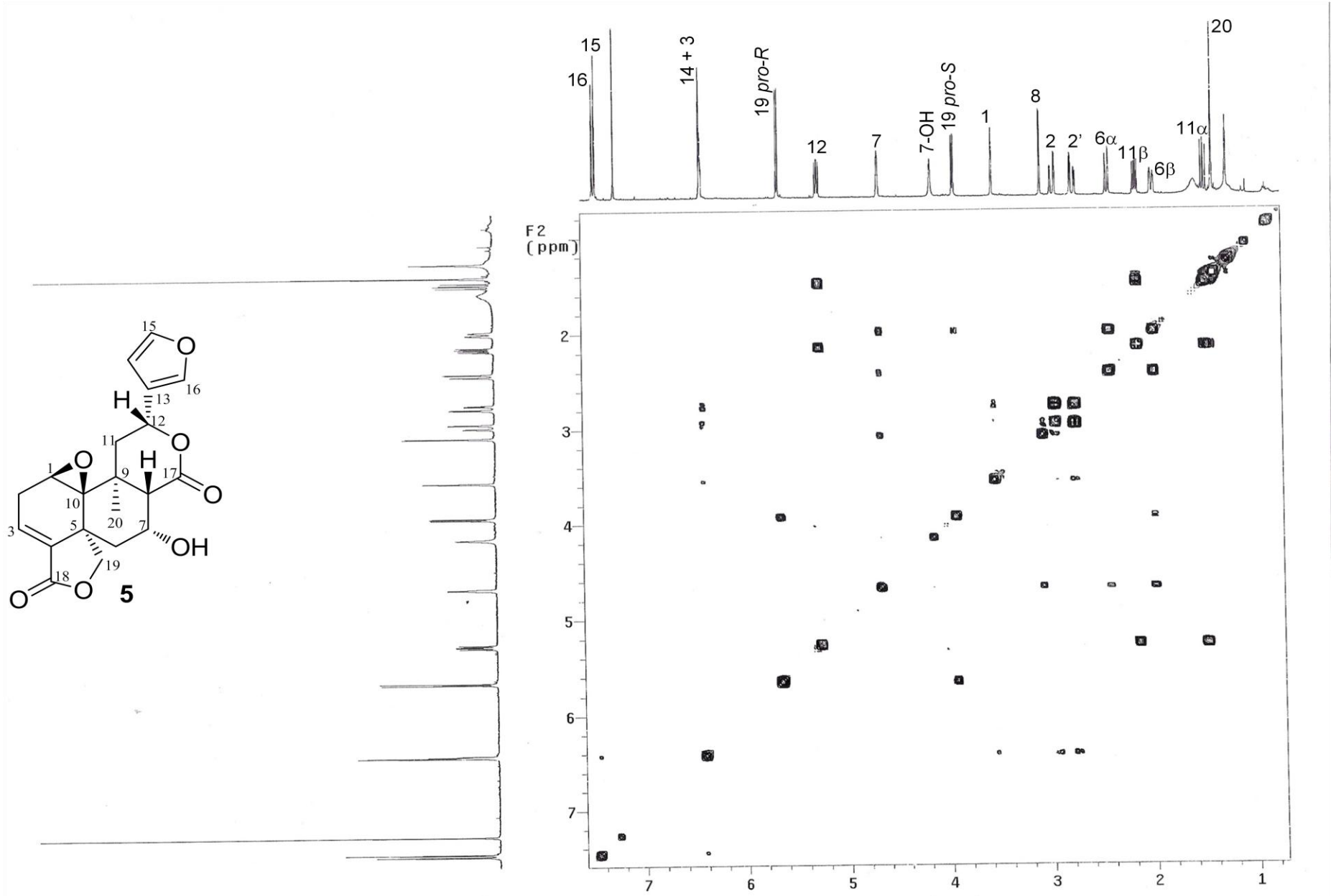
Espectro A-9: RMN de ¹H del compuesto **5** determinado en CDCl₃ a 500 MHz.



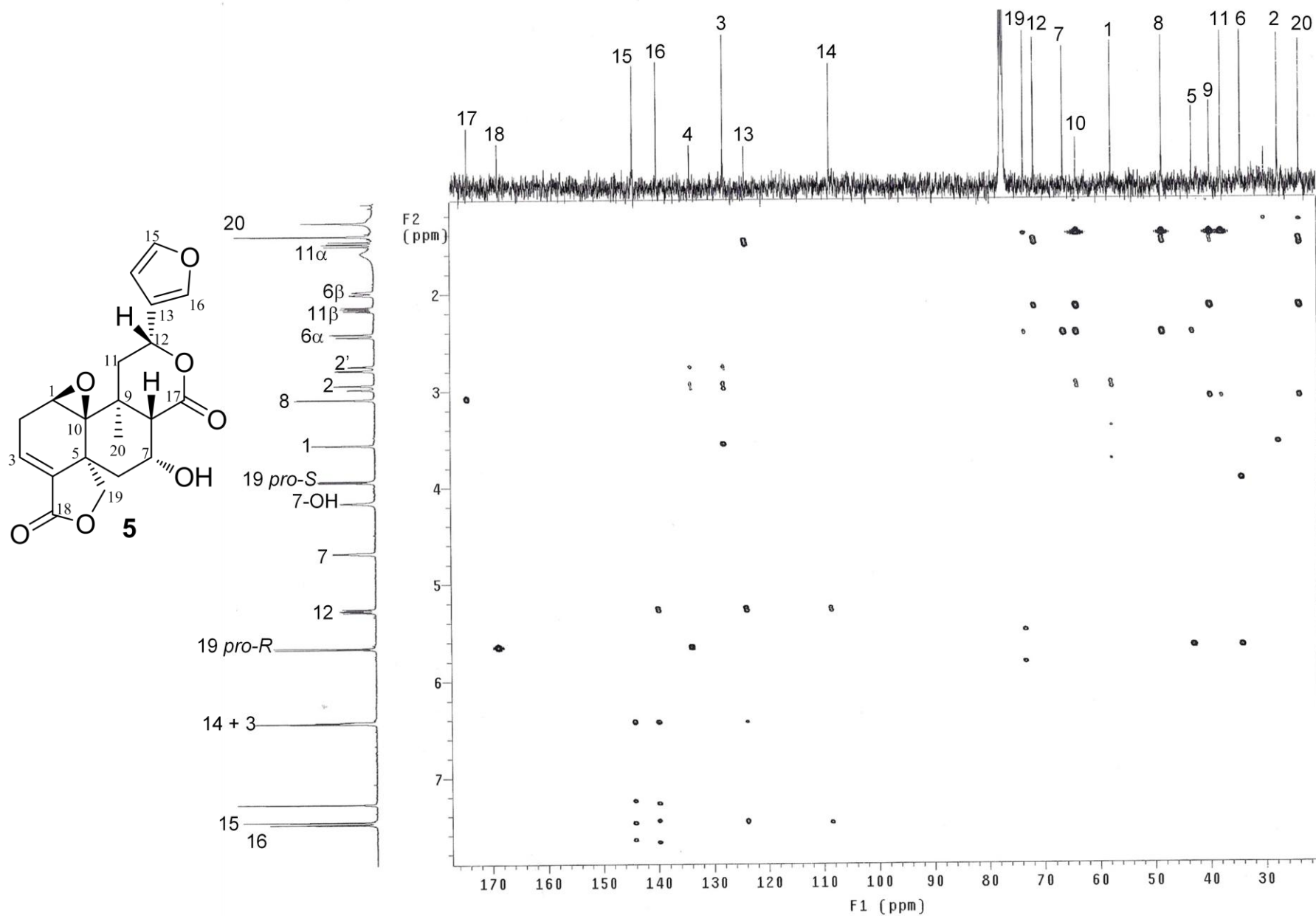
Espectro A-10: RMN de ¹³C del compuesto **5** determinado en CDCl₃ a 125 MHz.



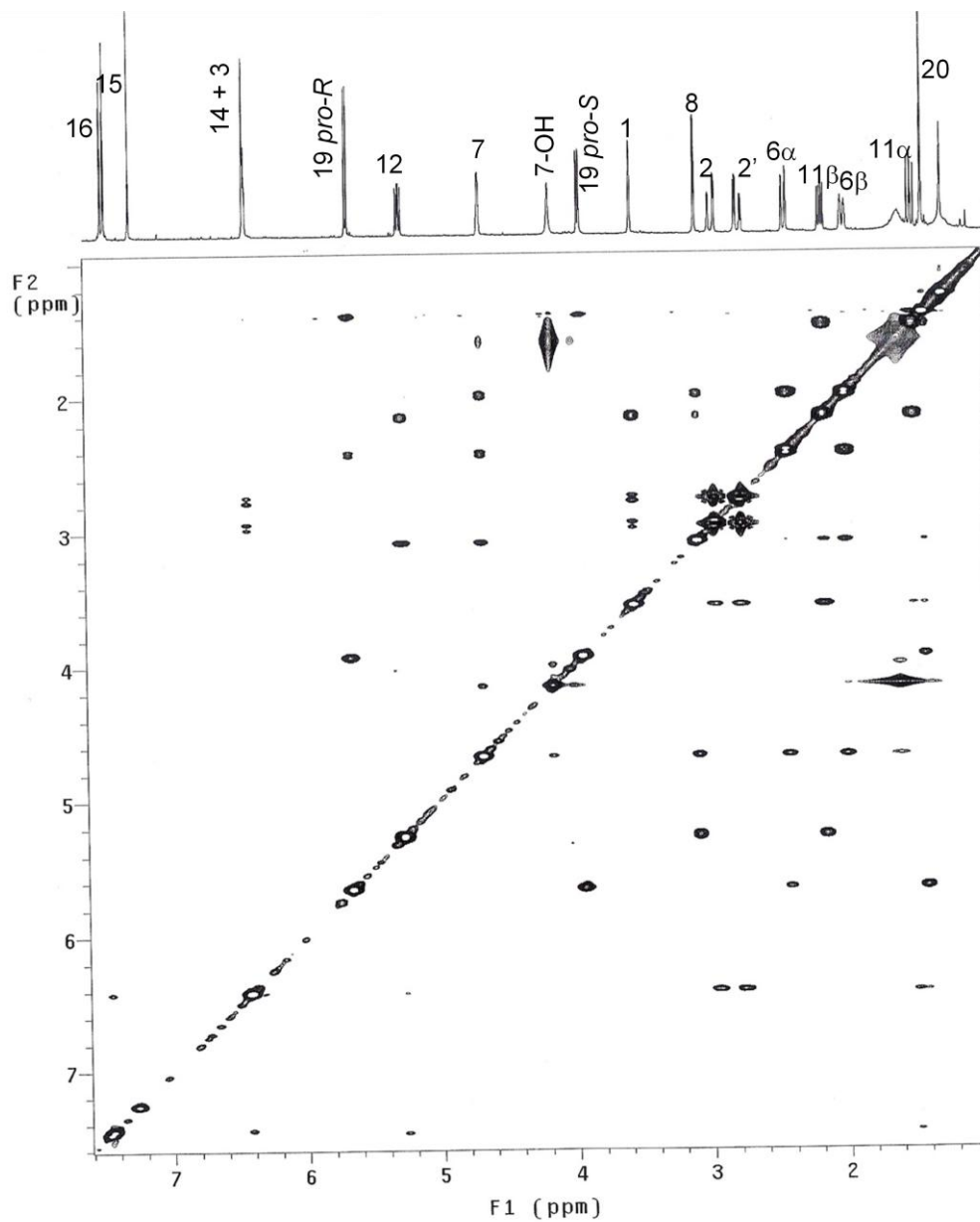
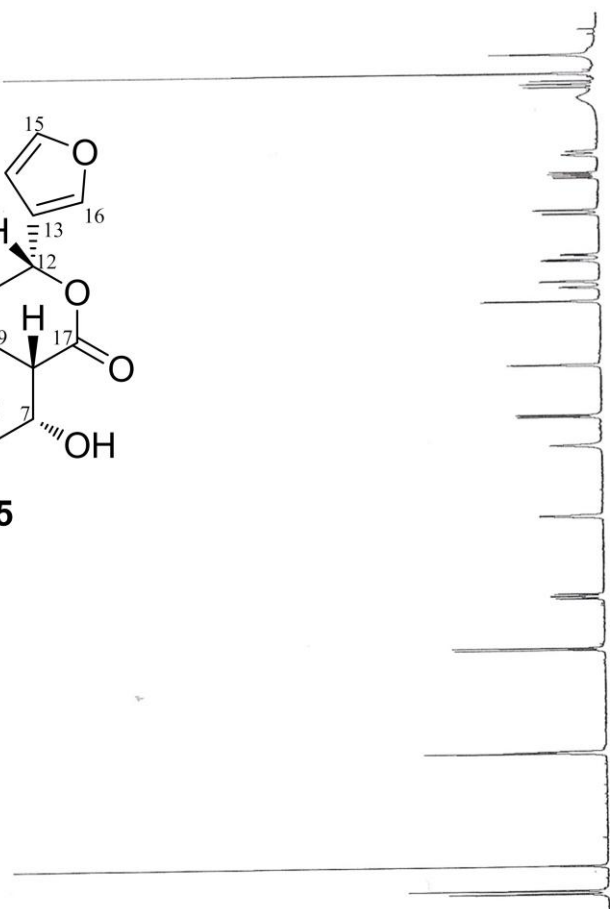
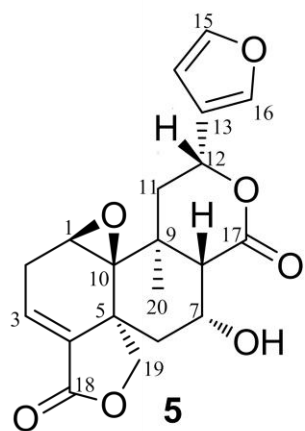
Espectro A-11: Experimento DEPT del compuesto **5** determinado en CDCl_3 .



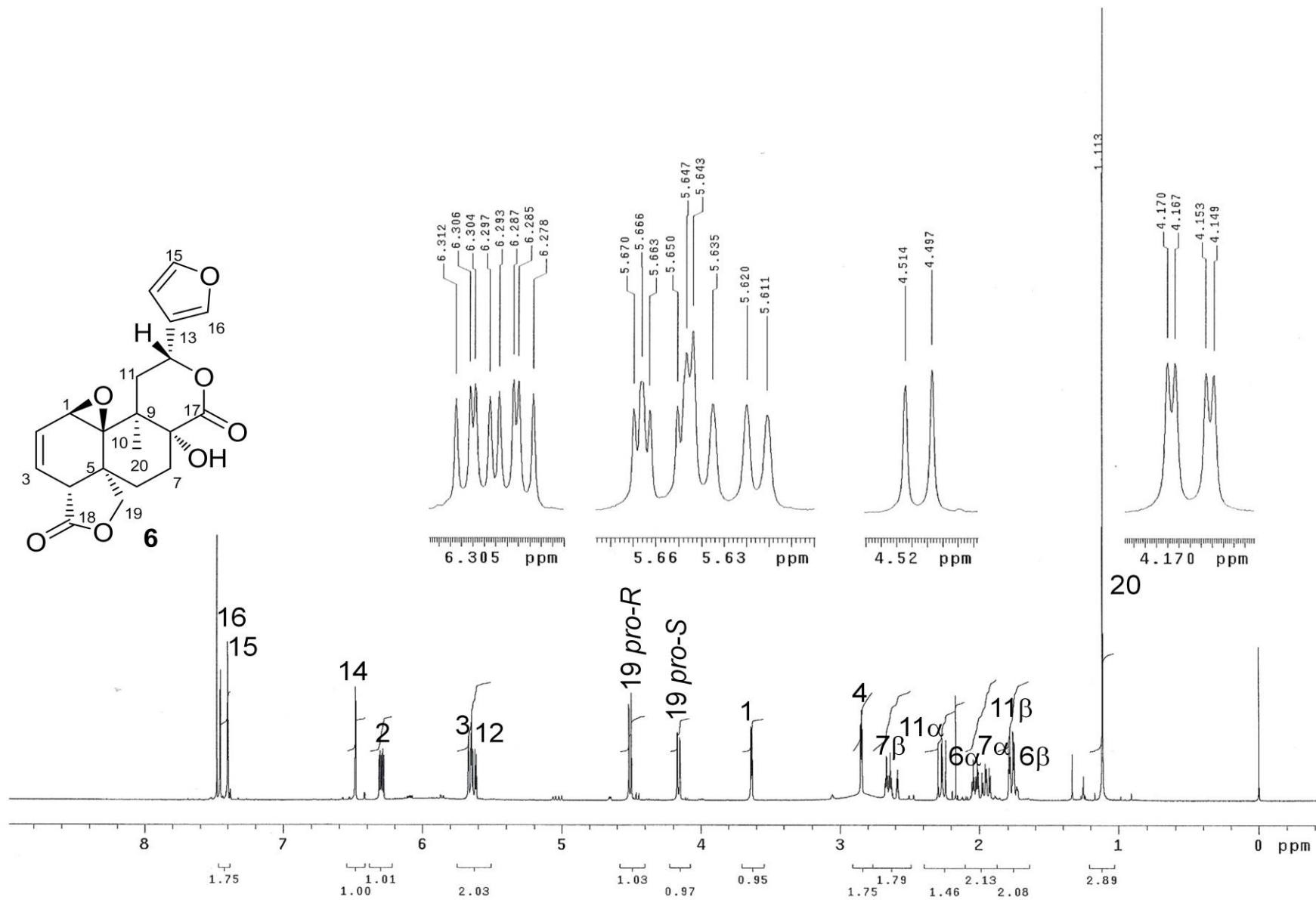
Espectro A-12: Experimento COSY del compuesto **5** determinado en CDCl_3 .



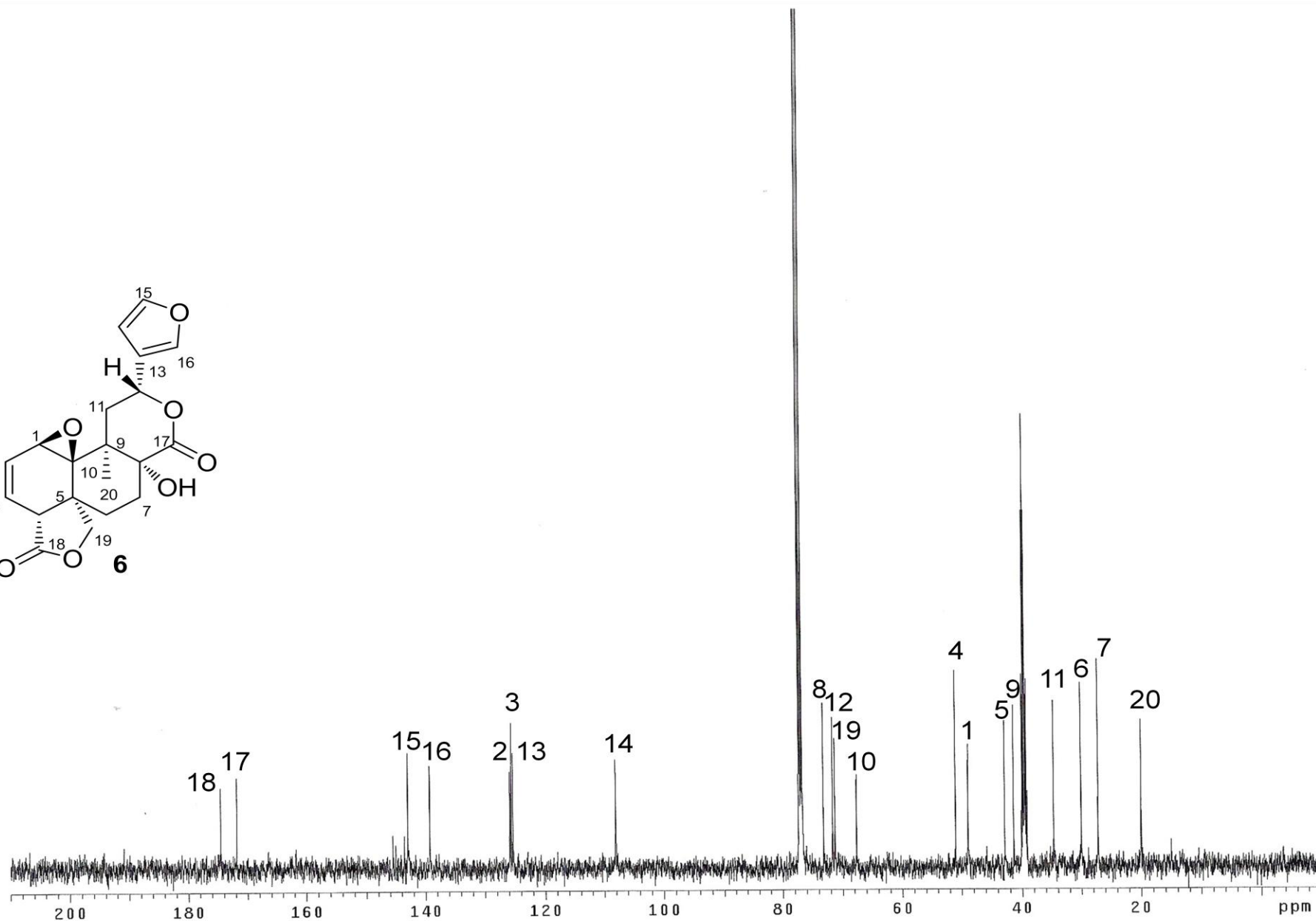
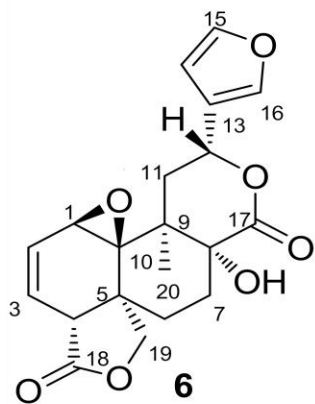
Espectro A-13: Experimento HMBC del compuesto **5** determinado en CDCl_3 .



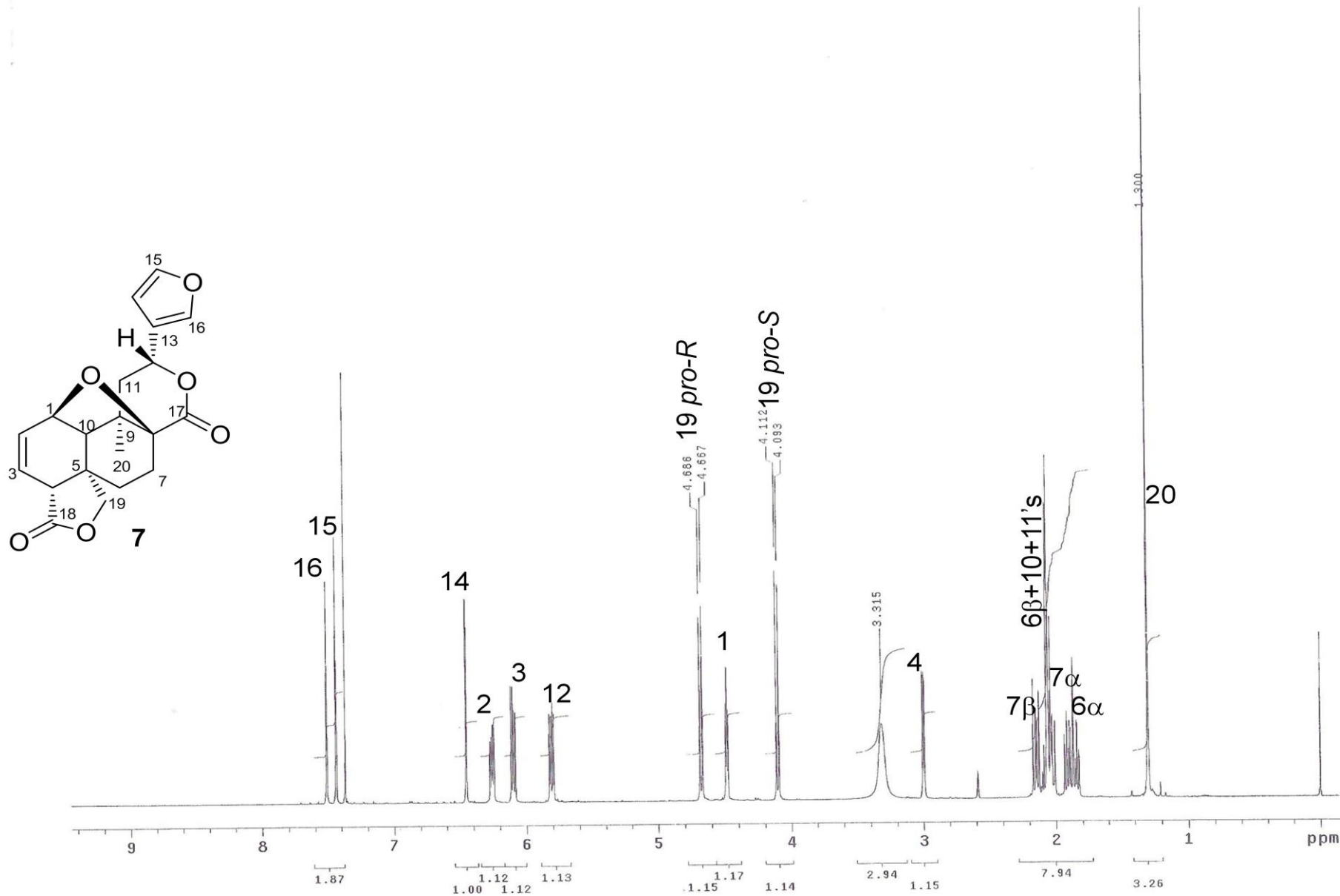
Espectro A-14: Experimento NOESY del compuesto **5** determinado en CDCl₃.



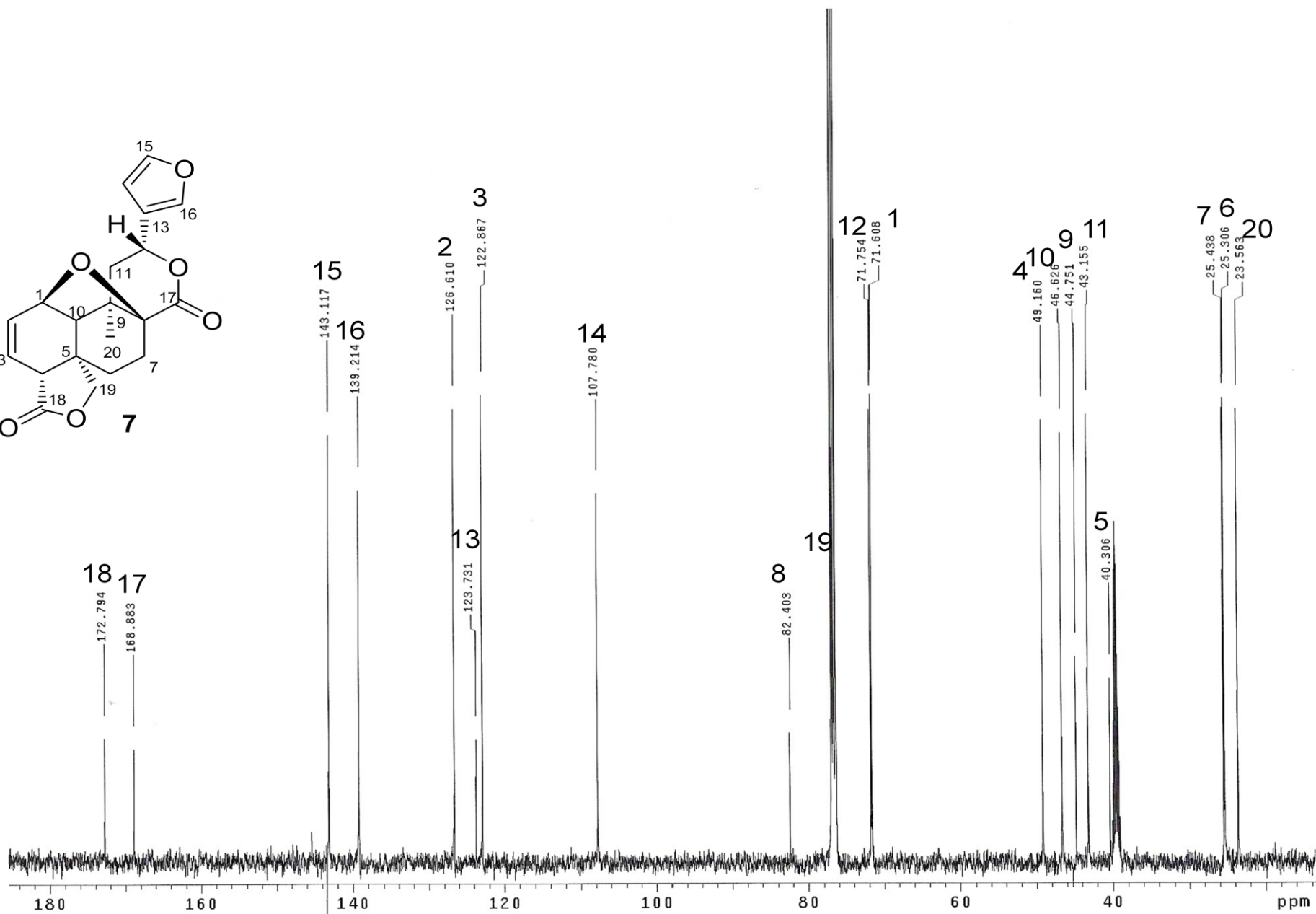
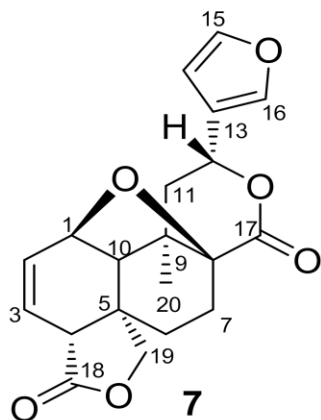
Espectro A-15: RMN de ^1H del compuesto **6** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$ a 500 MHz.



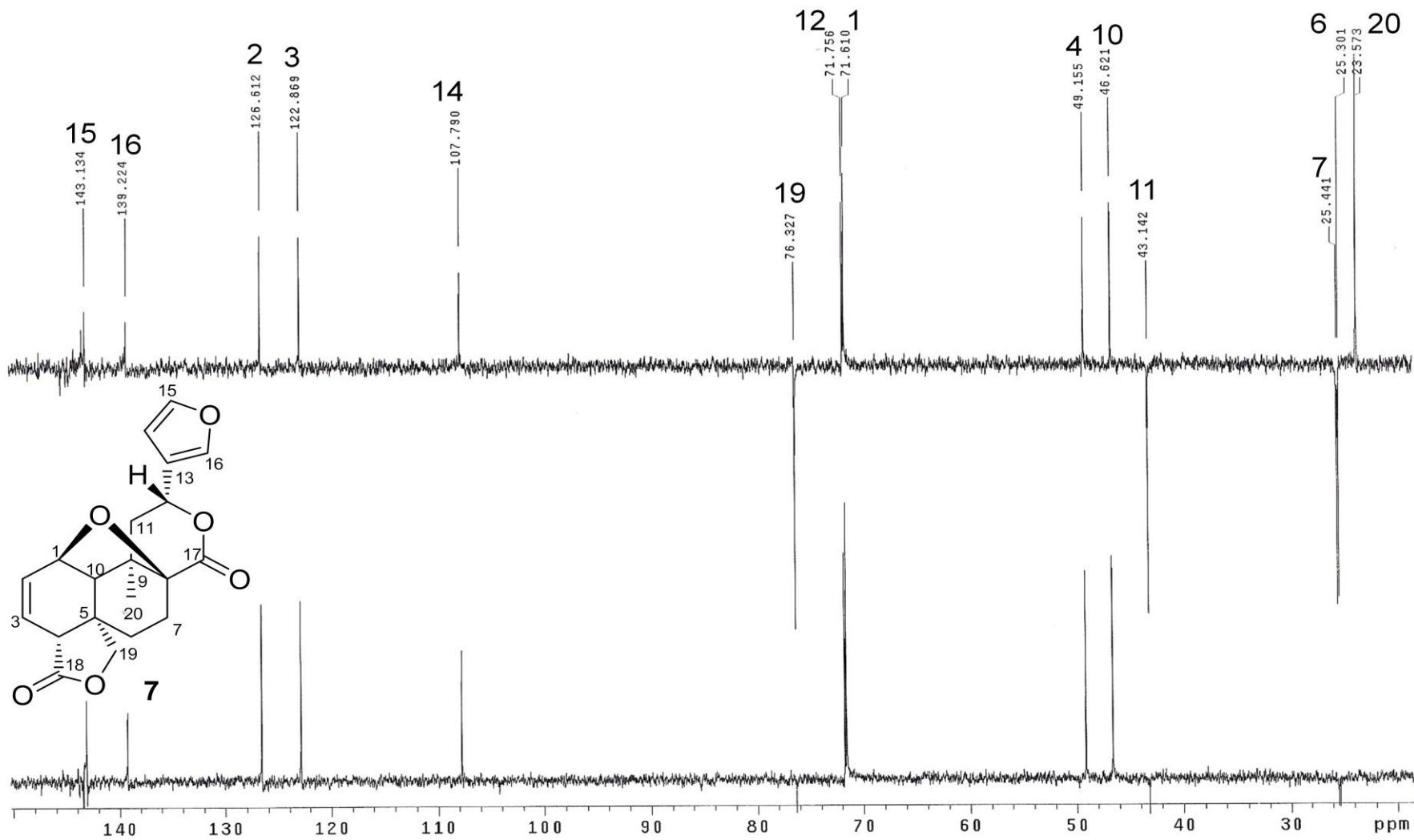
Espectro A-16: RMN de ^{13}C del compuesto **6** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$ a 125 MHz.



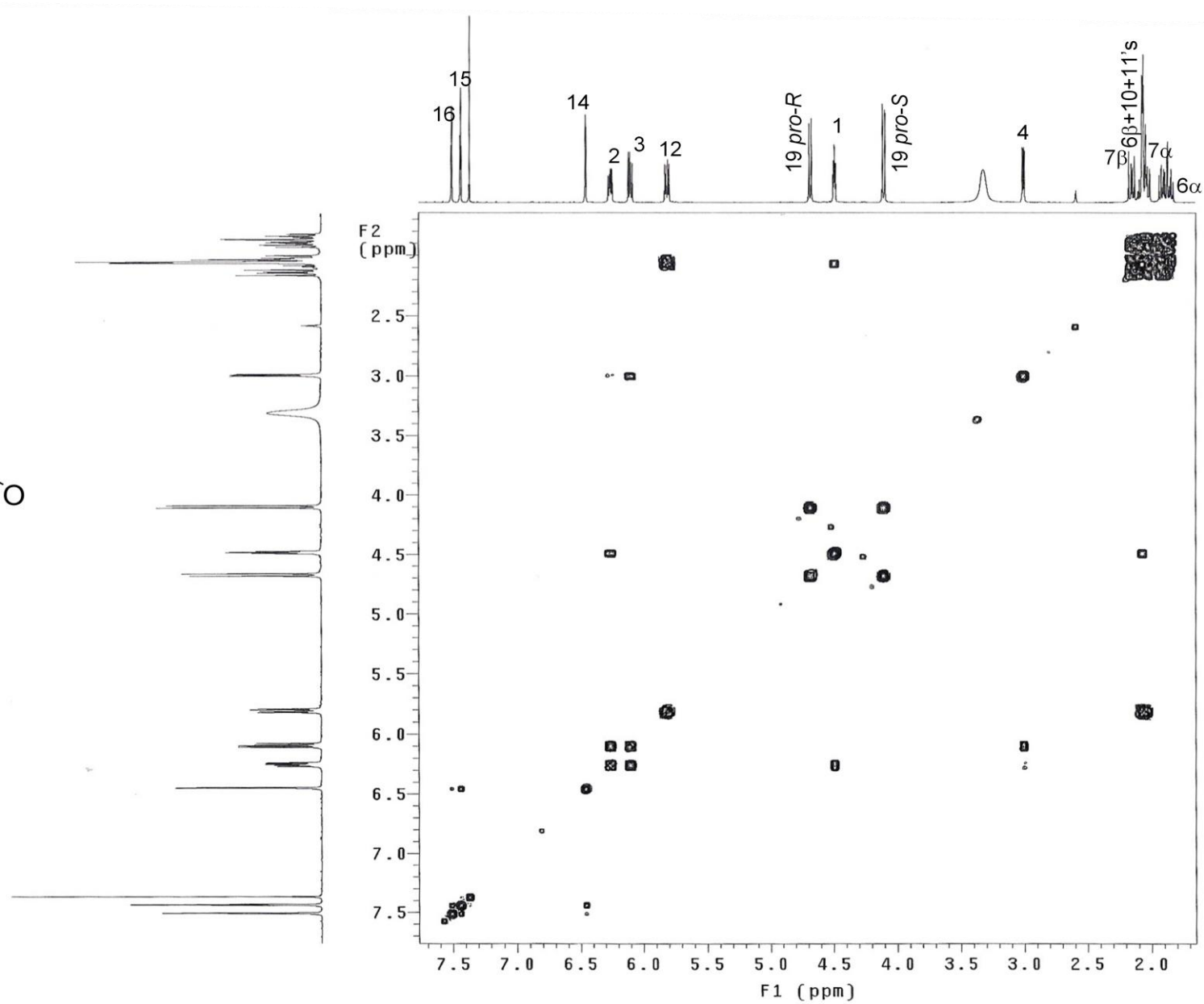
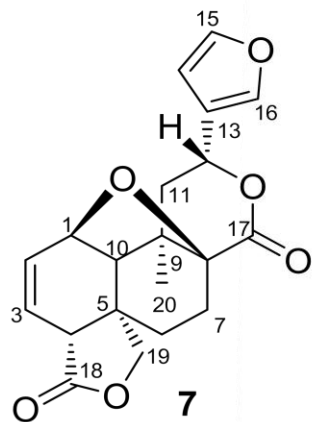
Espectro A-17: RMN de ¹H del compuesto **7** determinado en CDCl₃ + DMSO-d₆ a 500 MHz.



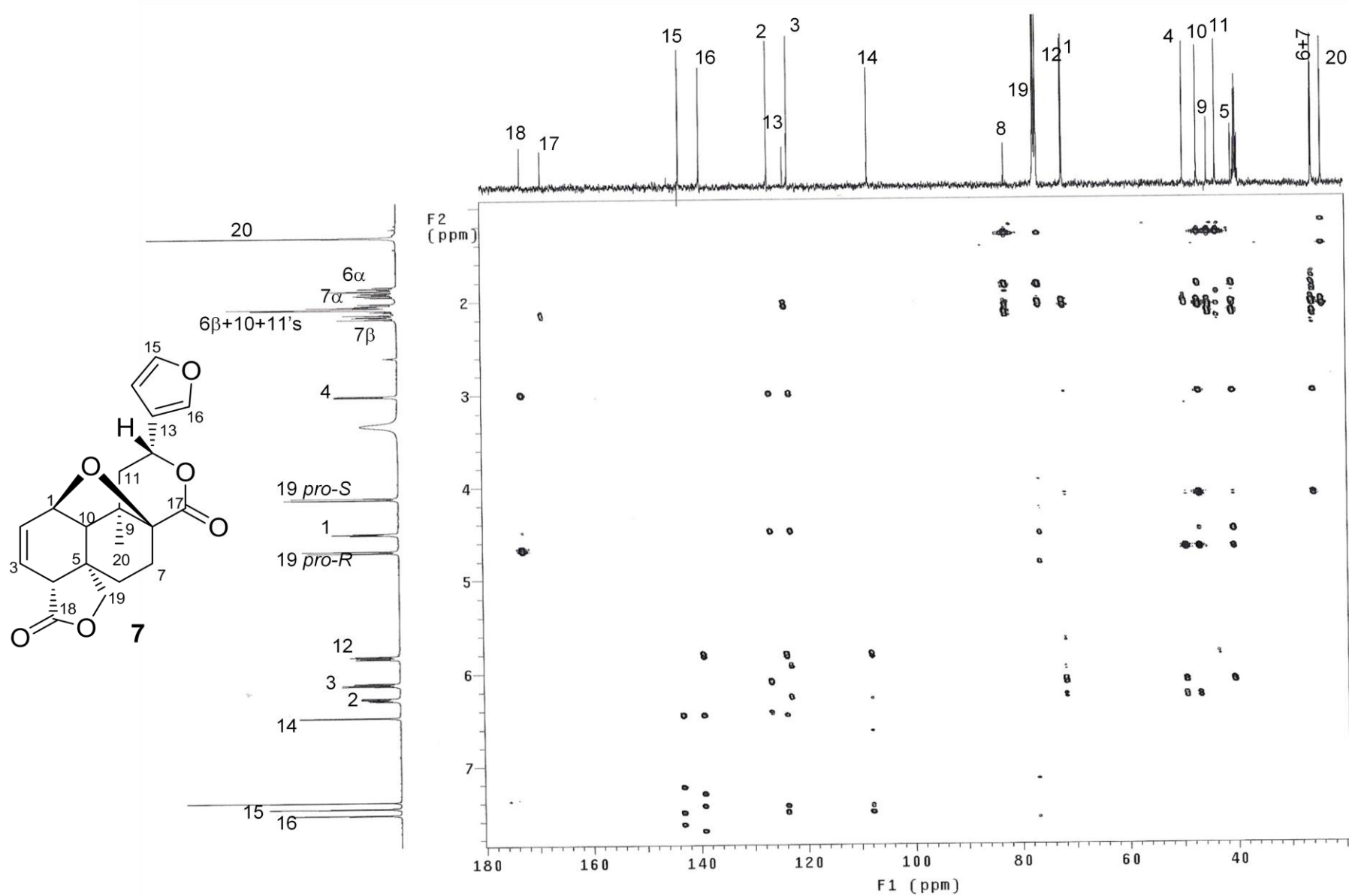
Espectro A-18: RMN de ^{13}C del compuesto **7** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$ a 125 MHz.



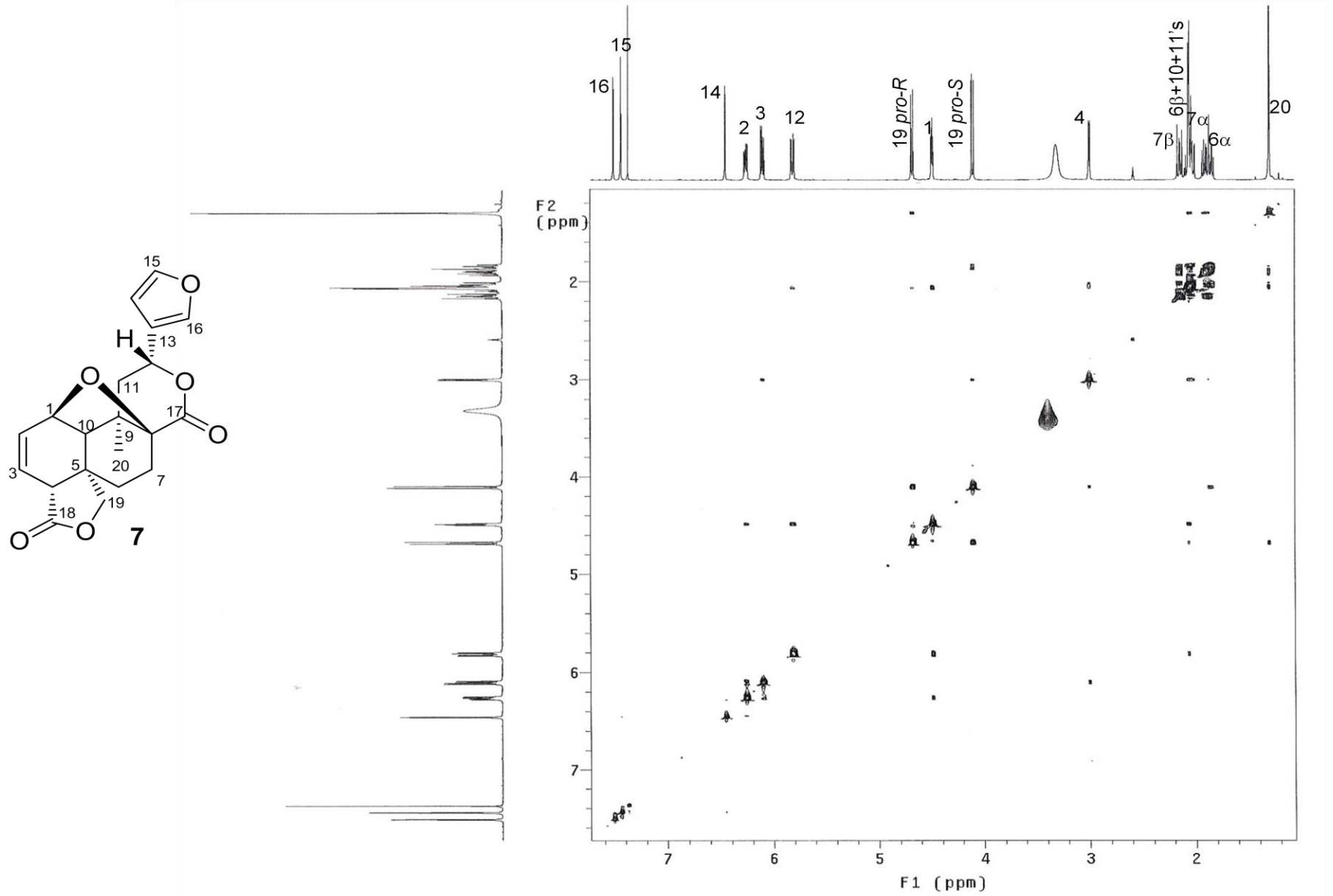
Espectro A-19: Experimento DEPT del compuesto 7 determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$.



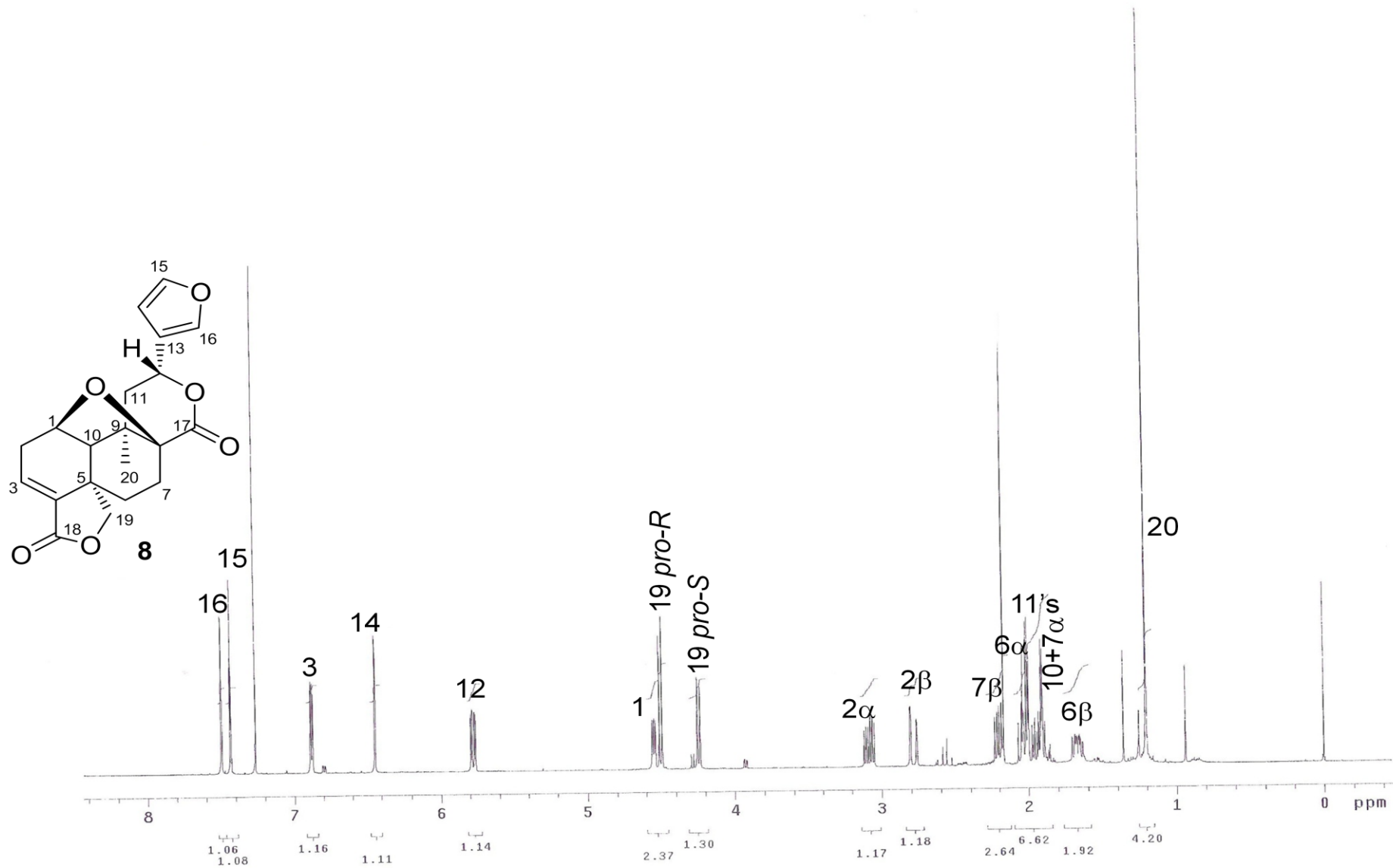
Espectro A-20: Experimento COSY del compuesto **7** determinado en CDCl₃ + DMSO-d₆.



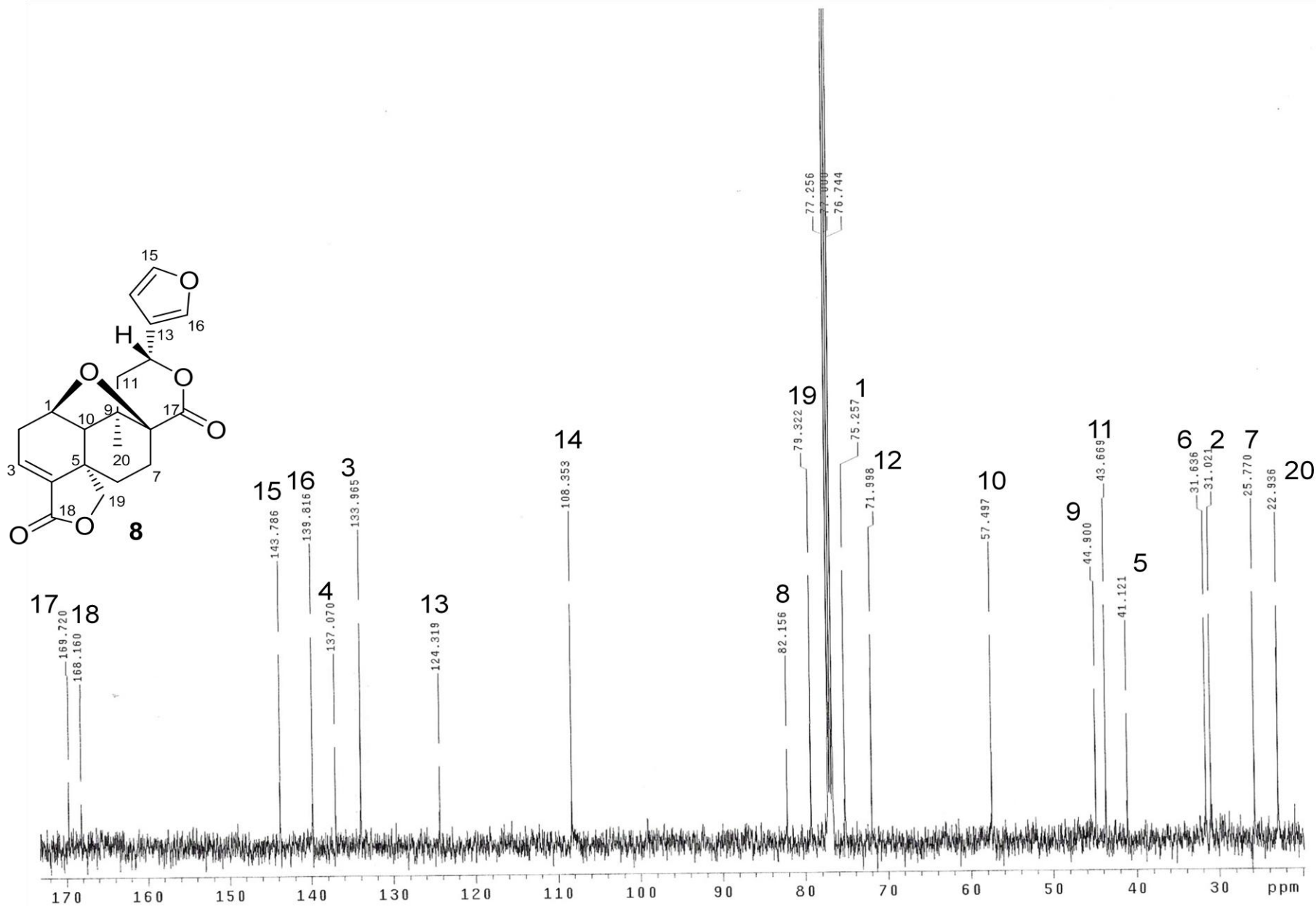
Espectro A-21: Experimento HMBC del compuesto **7** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$.



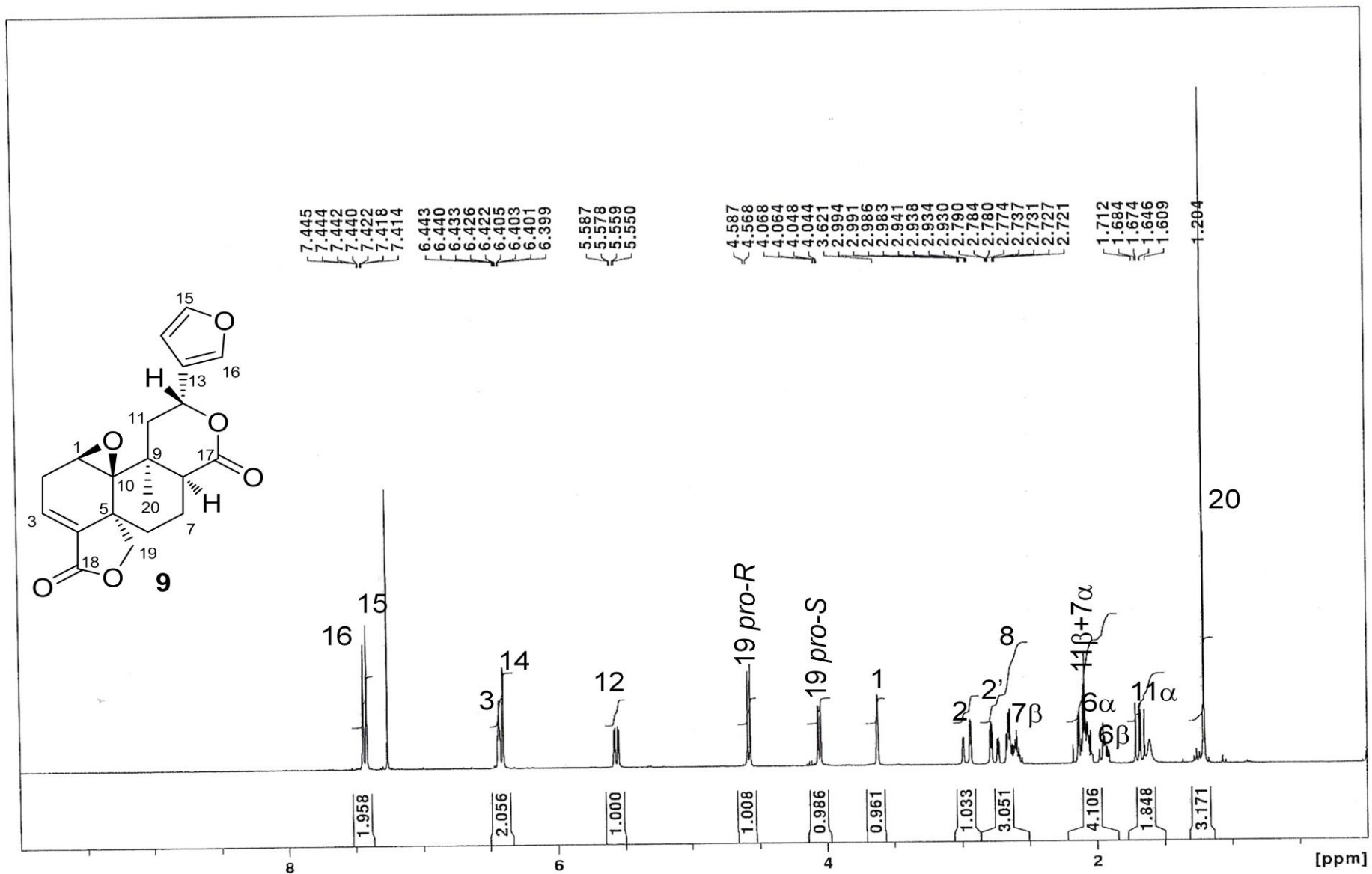
Espectro A-22: Experimento NOESY del compuesto **7** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$.



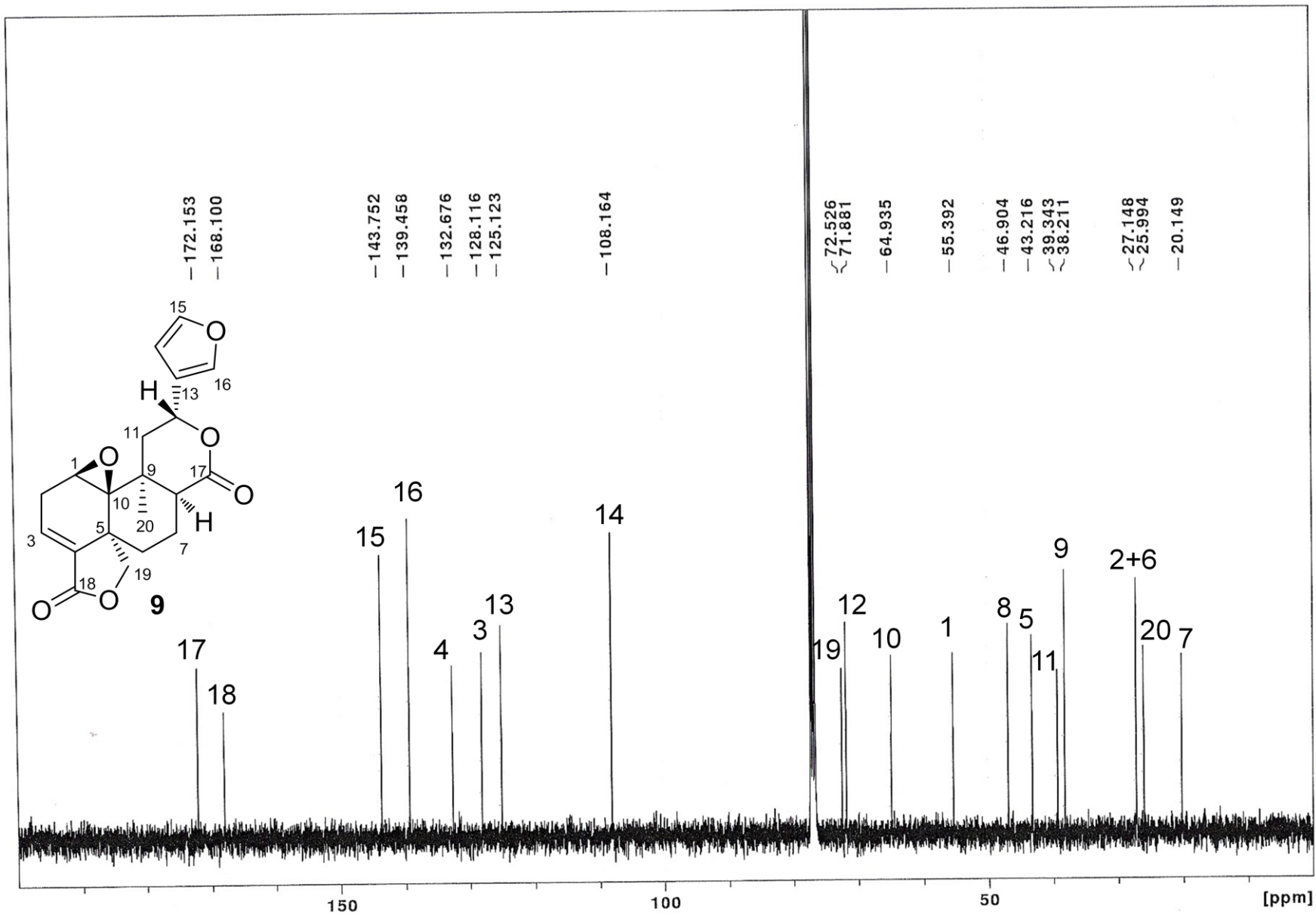
Espectro A-23: RMN de ¹H del compuesto **8** determinado en CDCl₃ a 500 MHz.



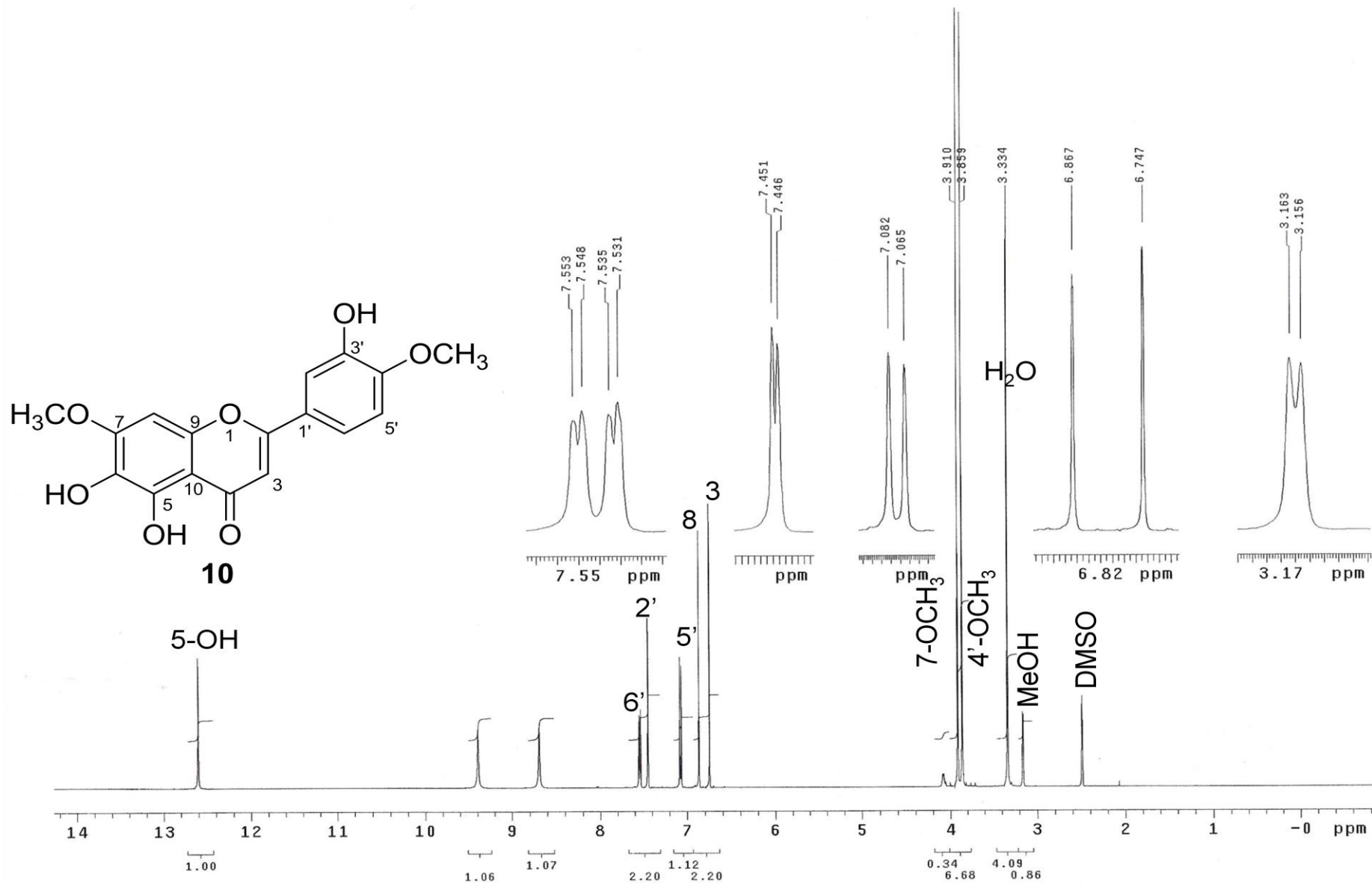
Espectro A-24: RMN de ¹H del compuesto **8** determinado en CDCl₃ a 500 MHz.



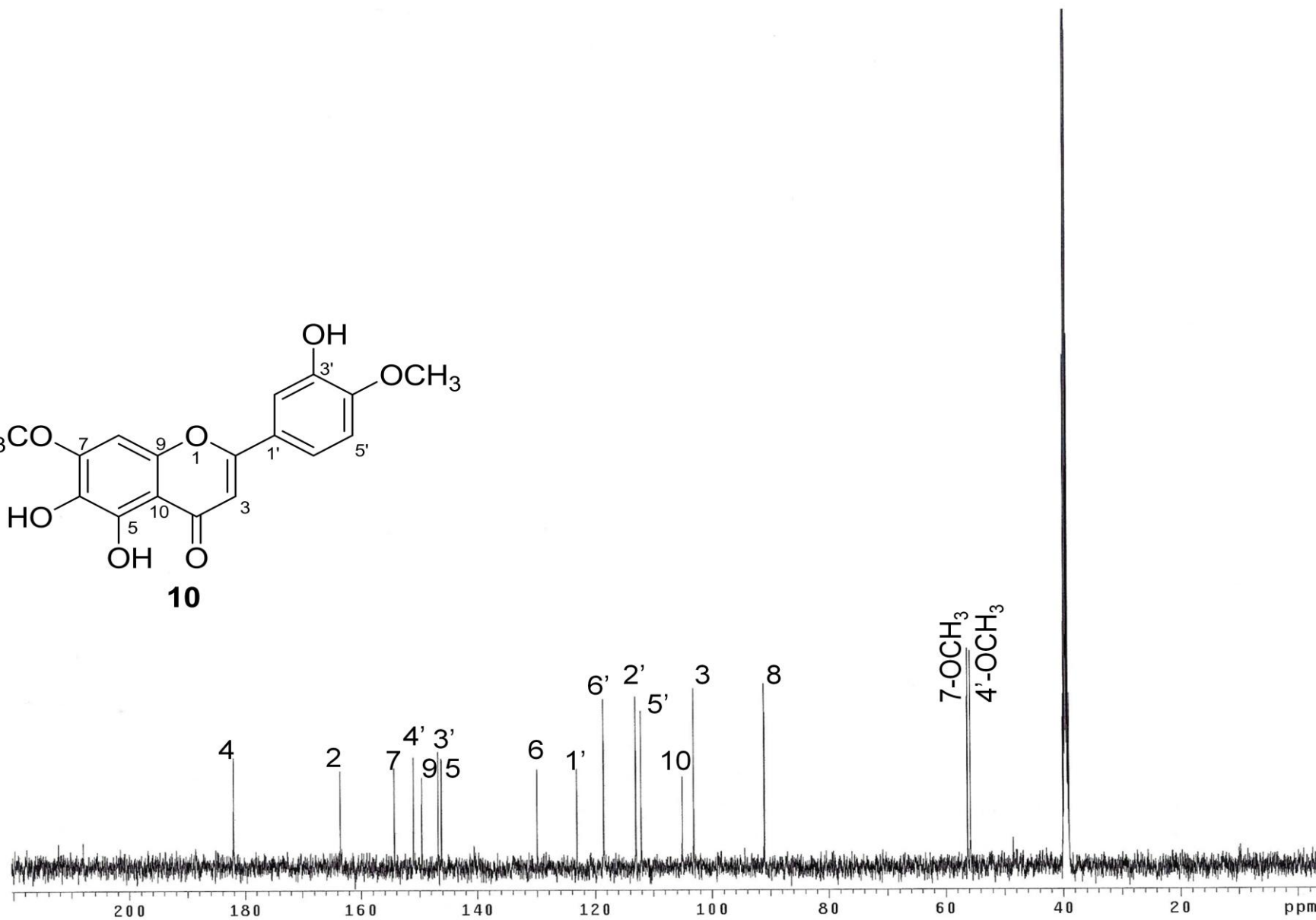
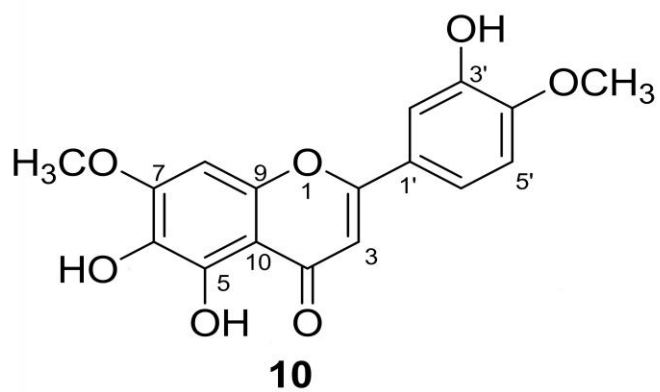
Espectro A-25: RMN de ^1H del compuesto **9** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$ a 400 MHz.



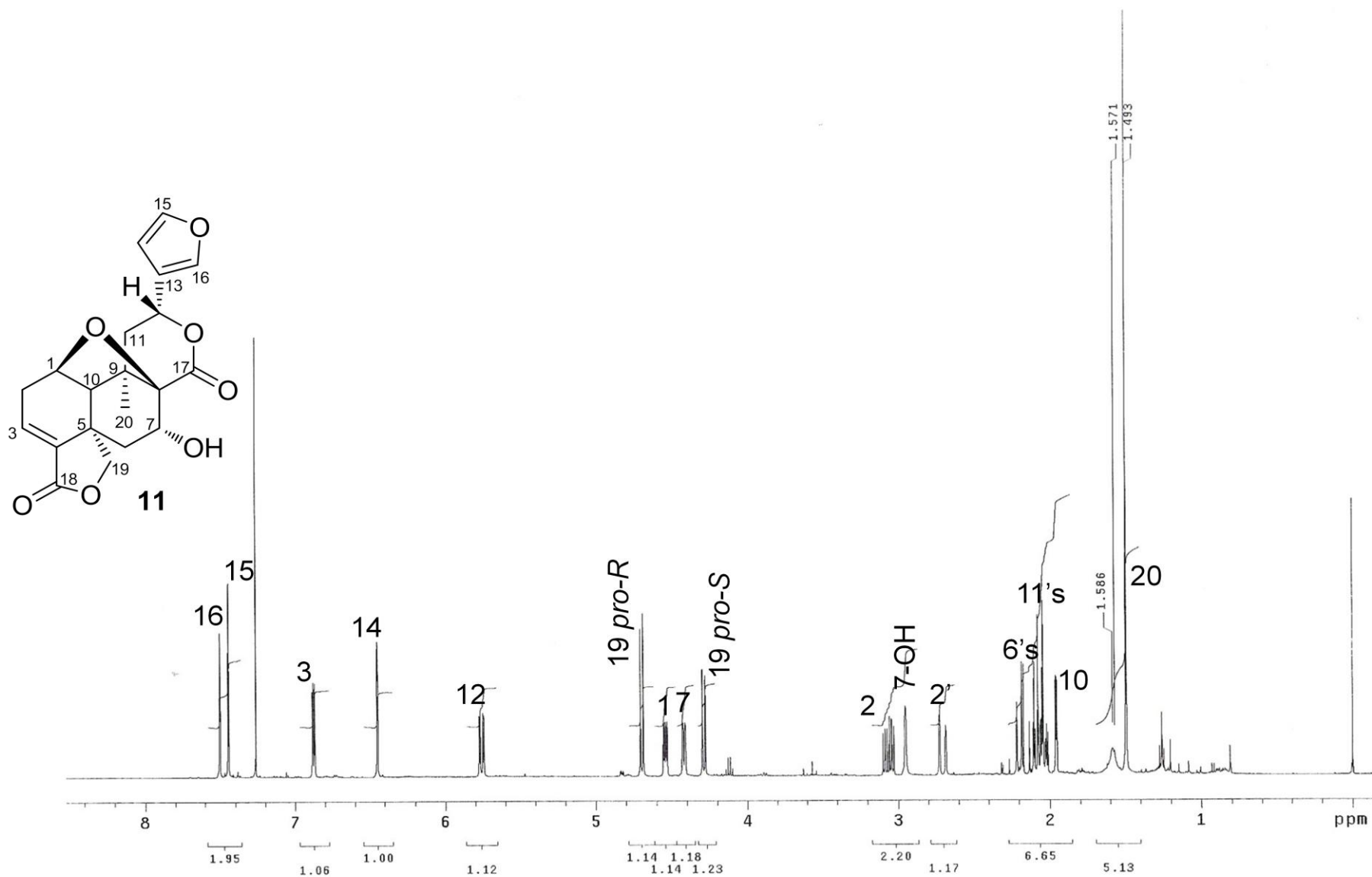
Espectro A-26: RMN de ^{13}C del compuesto **9** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$ a 100 MHz.



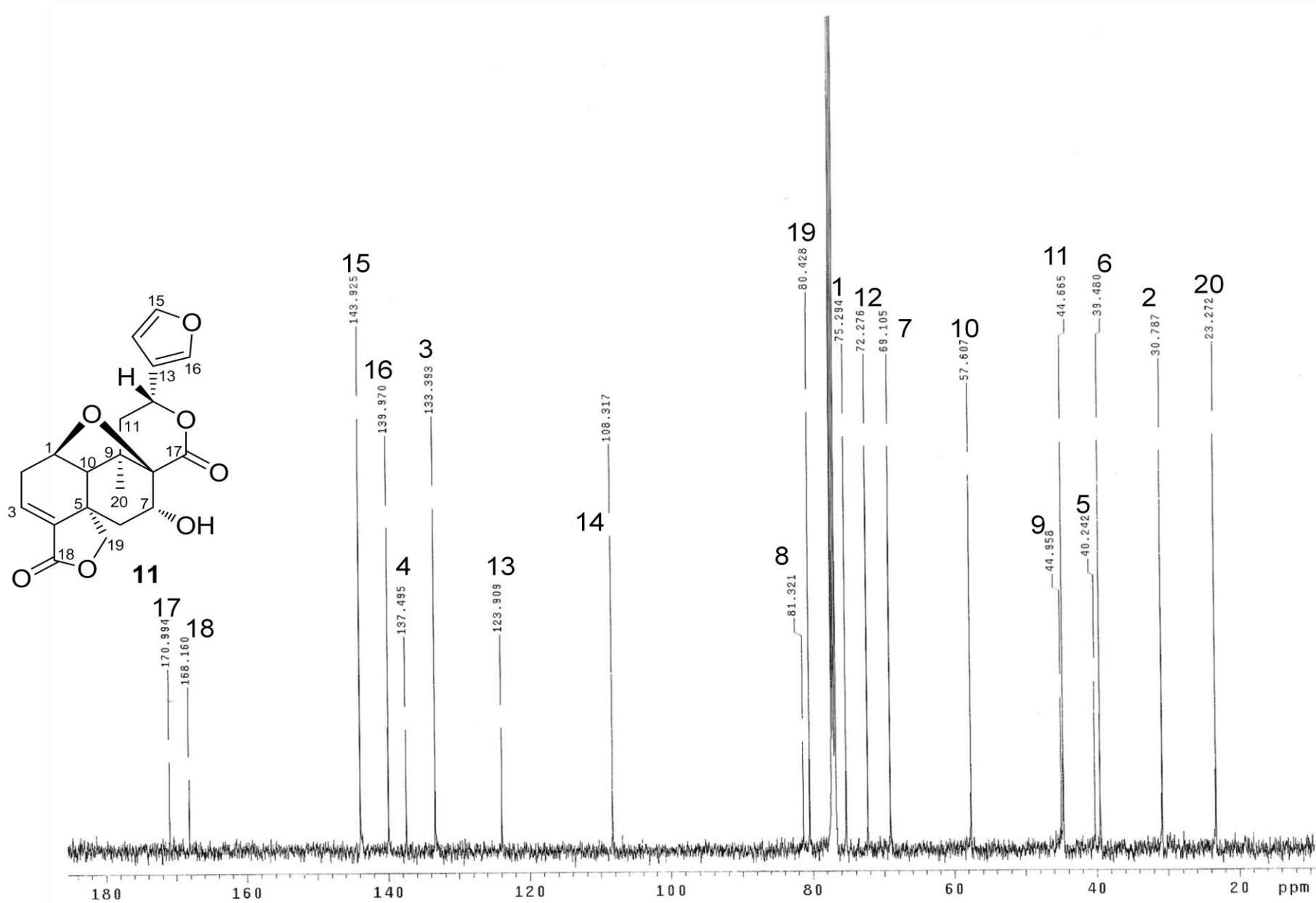
Espectro A-27: RMN de ¹H del compuesto **10** determinado en DMSO-d₆ a 500 MHz.



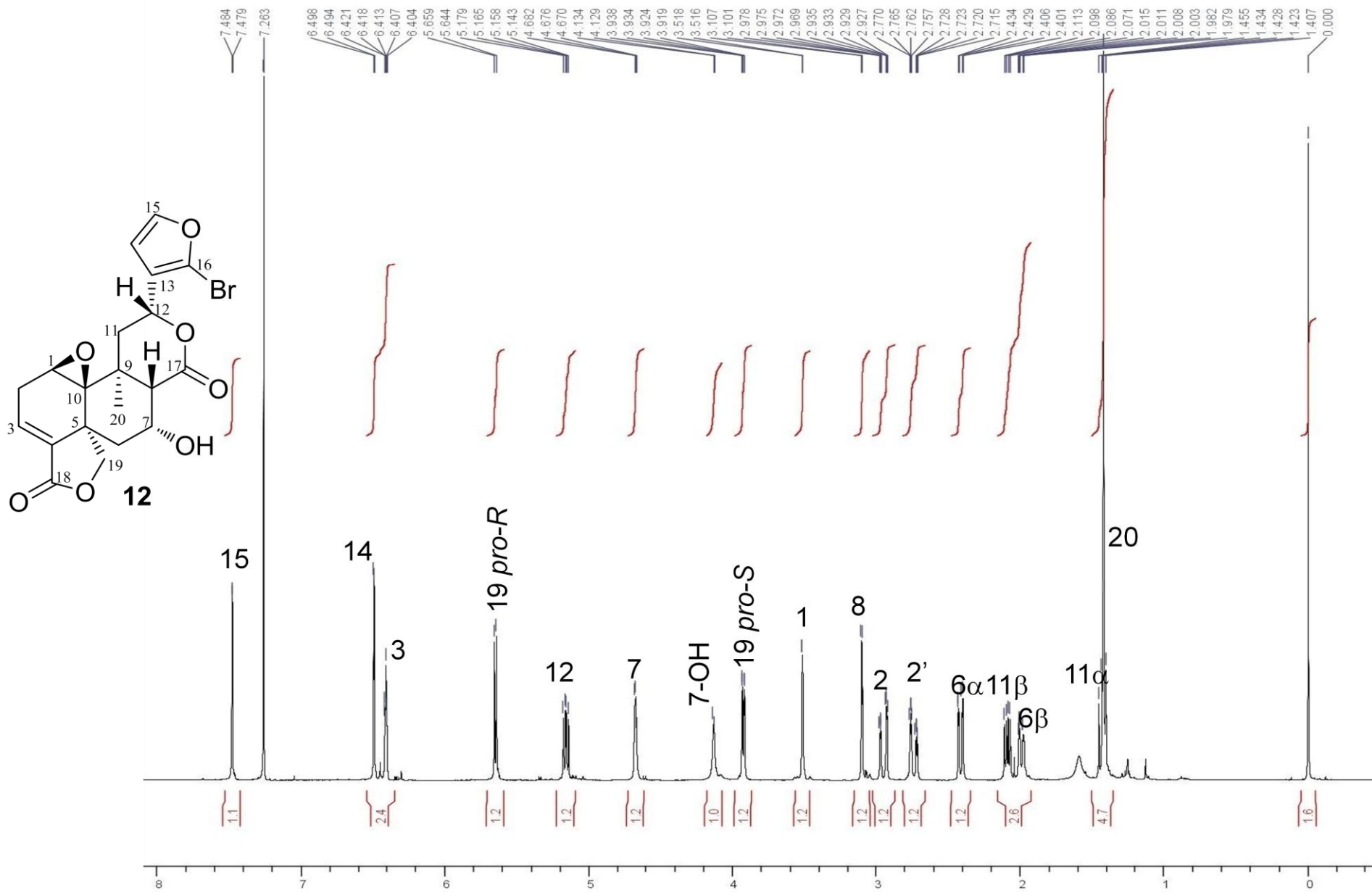
Espectro A-28: RMN de ^{13}C del compuesto **10** determinado en DMSO-d_6 a 125 MHz.



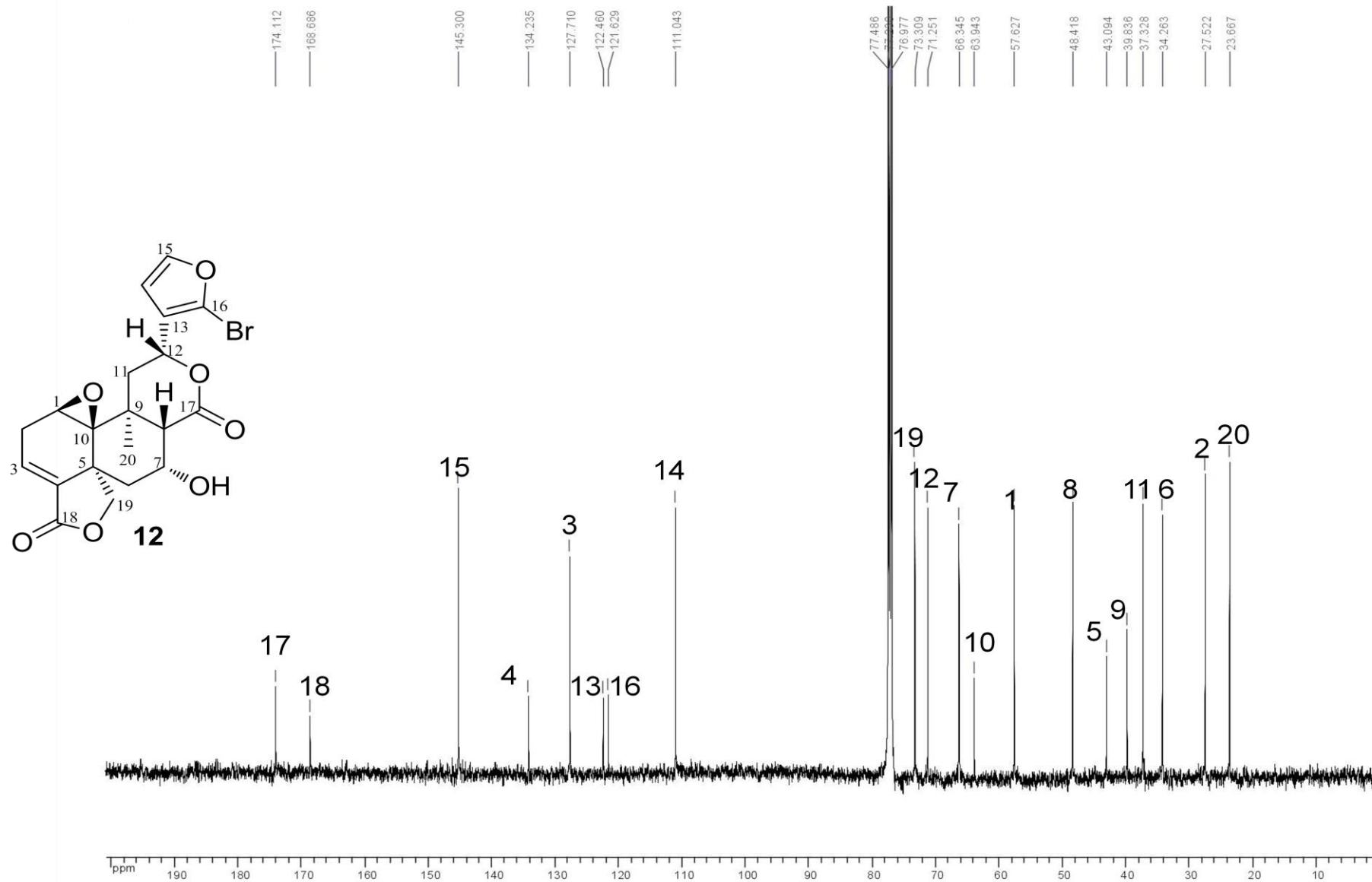
Espectro A-29: RMN de ¹H del compuesto **11** determinado en CDCl₃ a 500 MHz.



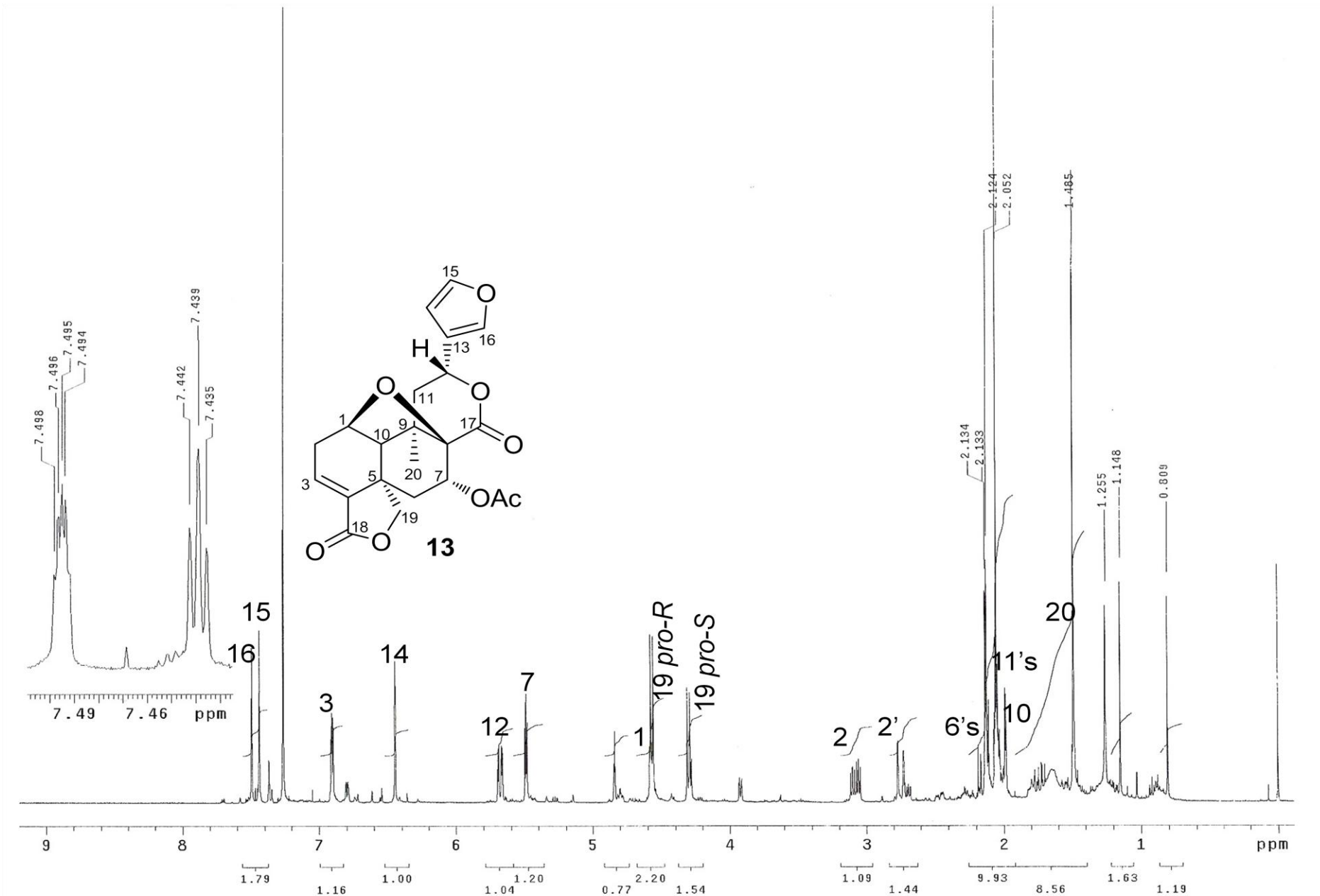
Espectro A-30: RMN de ^{13}C del compuesto **11** determinado en CDCl_3 a 125 MHz.



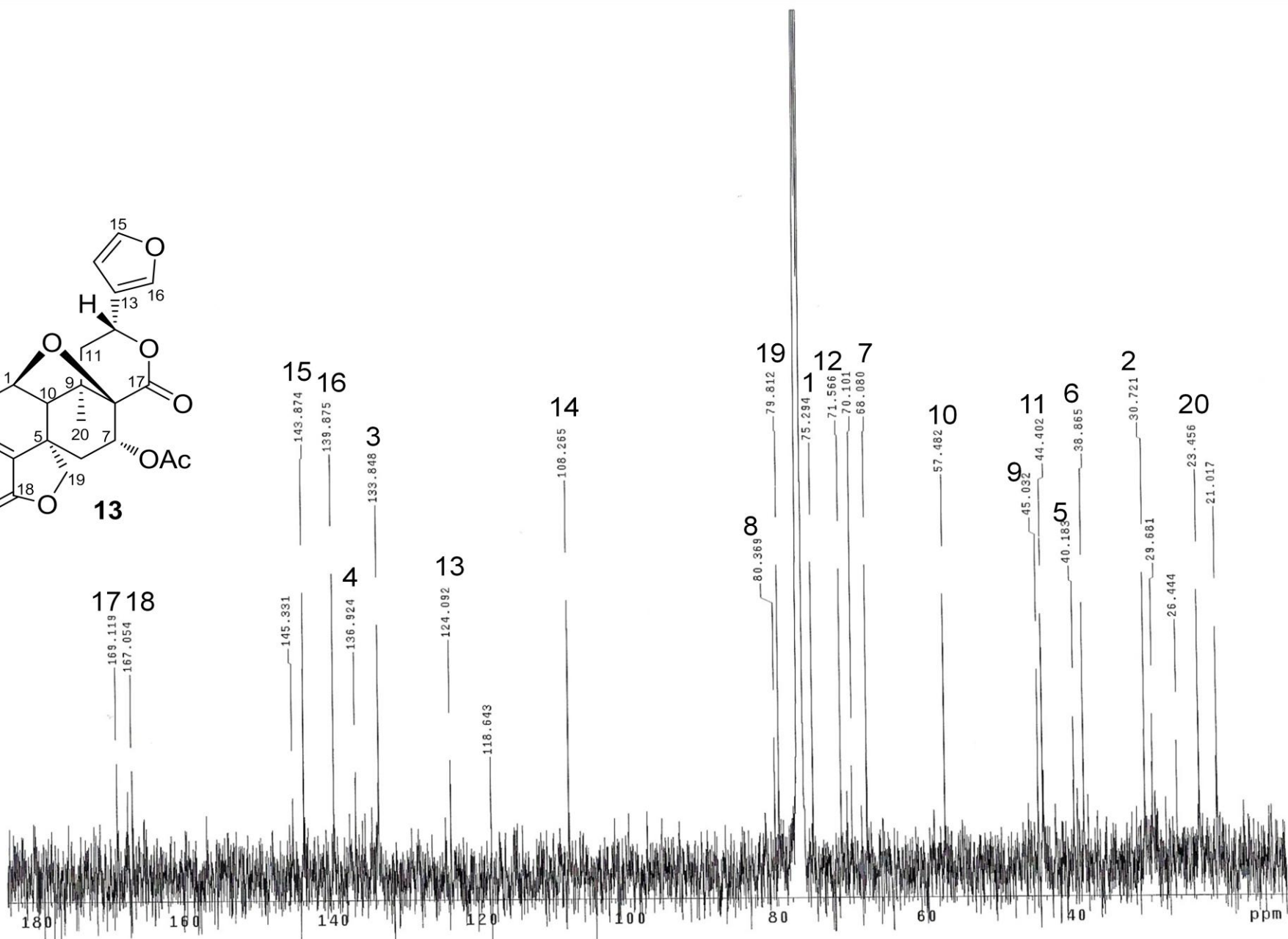
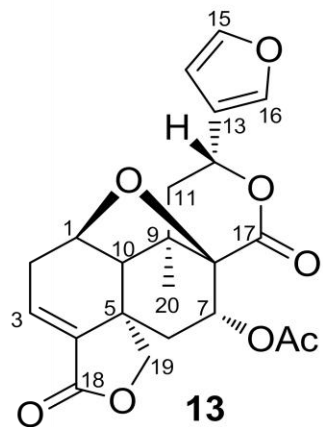
Espectro A-31: RMN de ¹H del compuesto **12** determinado en CDCl₃ a 500 MHz.



Espectro A-32: RMN de ¹³C del compuesto **12** determinado en CDCl₃ a 125 MHz.



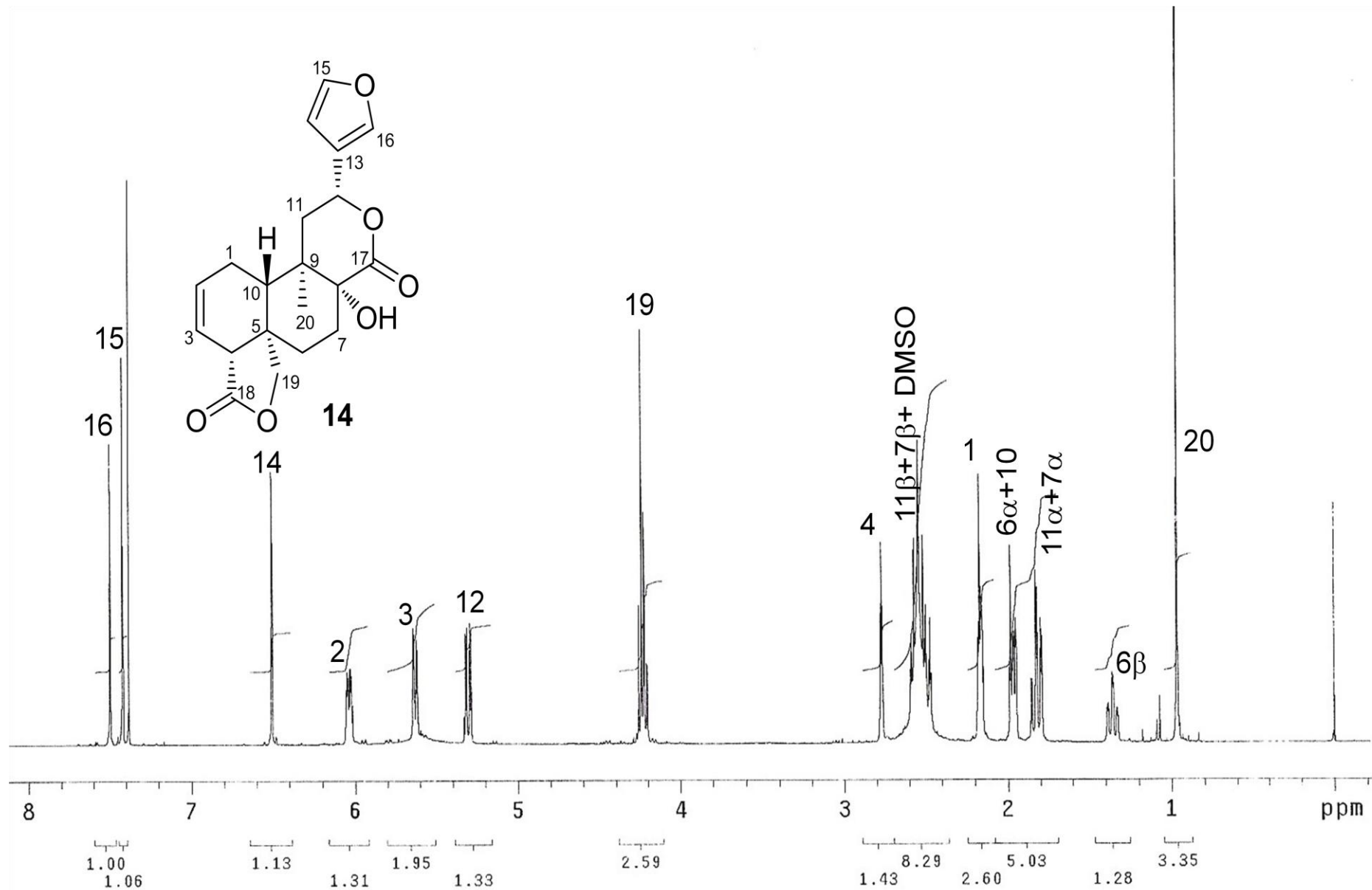
Espectro A-33: RMN de ¹H del compuesto **13** determinado en CDCl₃ a 500 MHz.



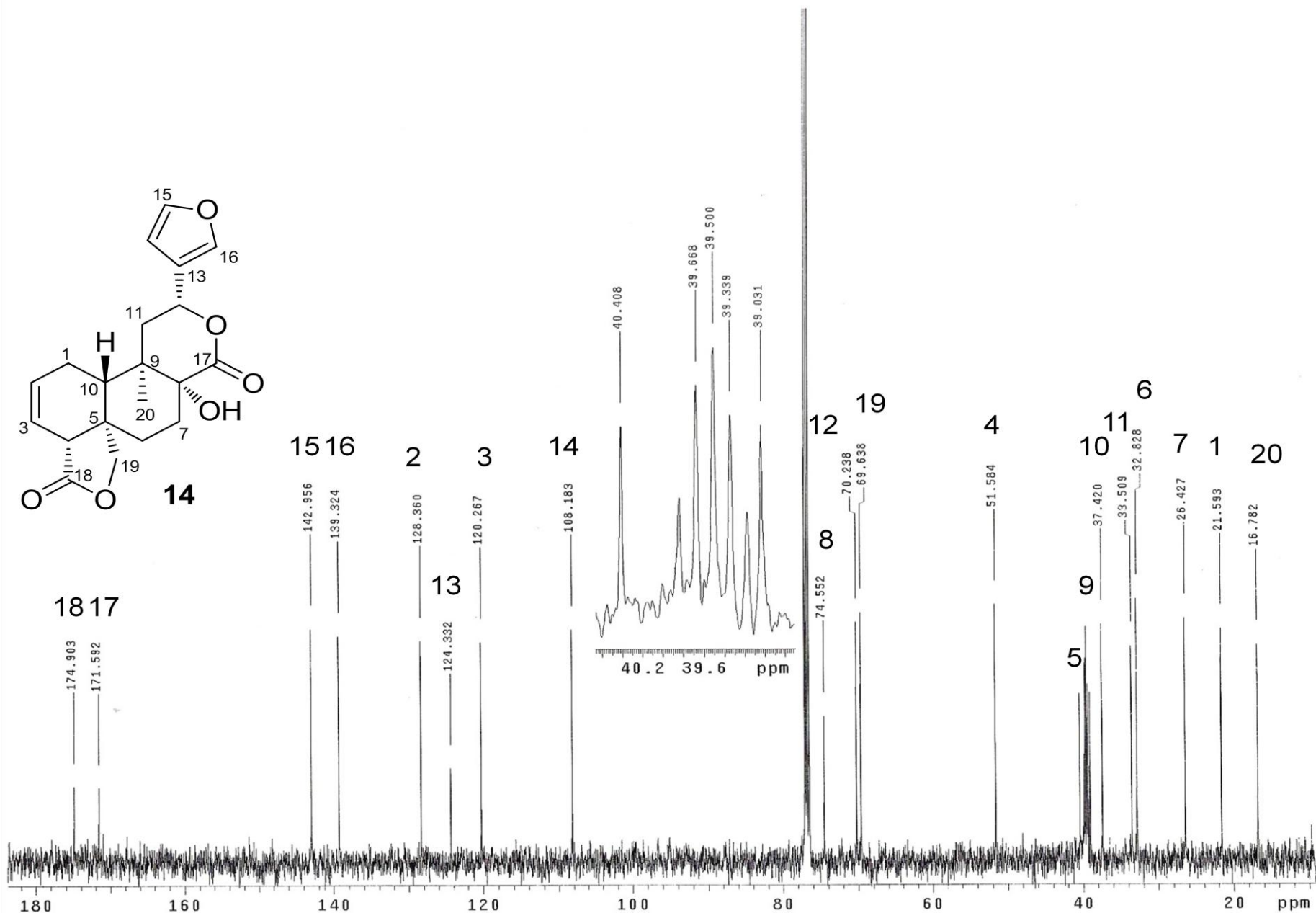
Espectro A-34: RMN de ^{13}C del compuesto **13** determinado en CDCl_3 a 125 MHz.

Apéndice B

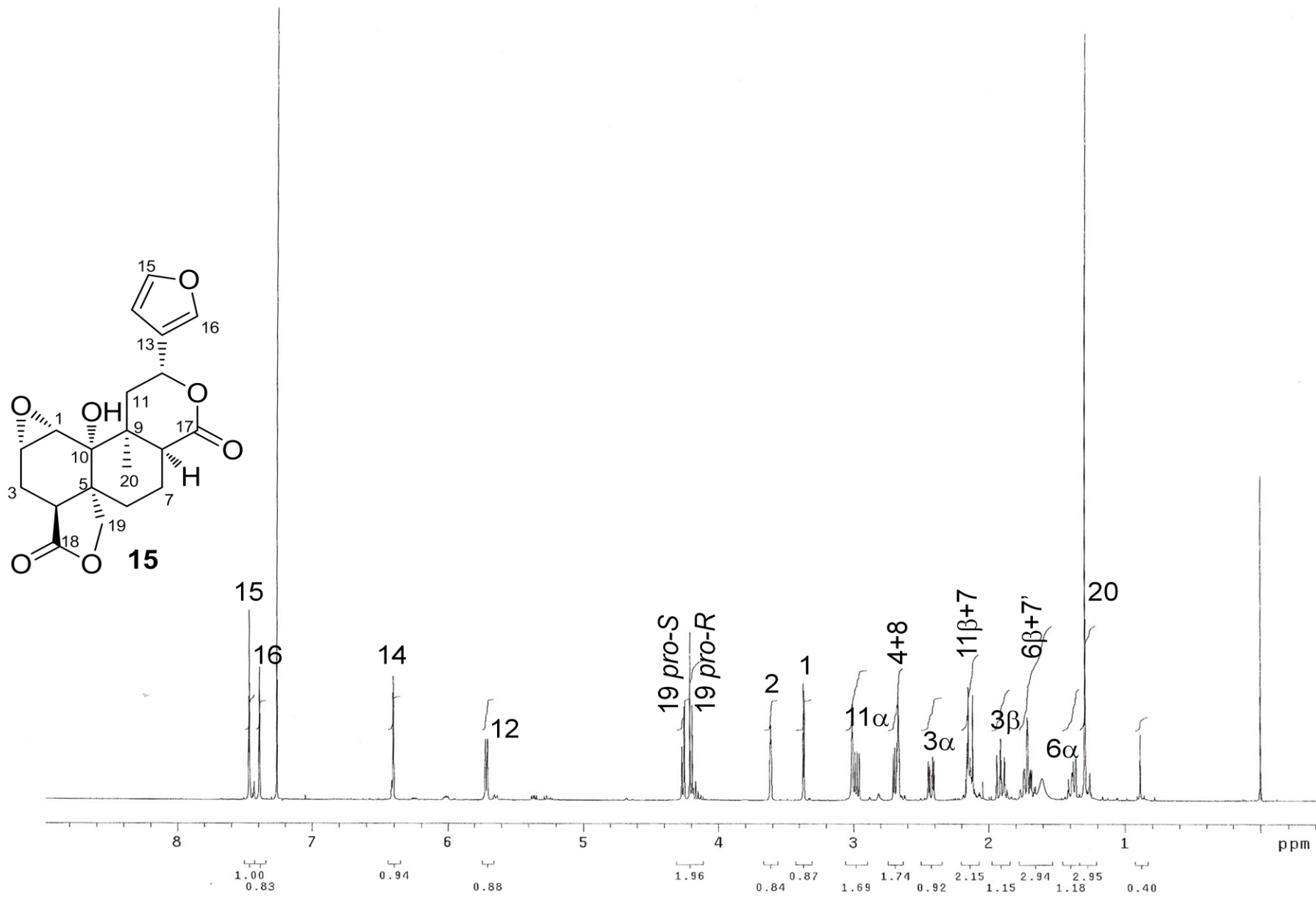
Espectros de RMN de los compuestos aislados de *Salvia shannoni*



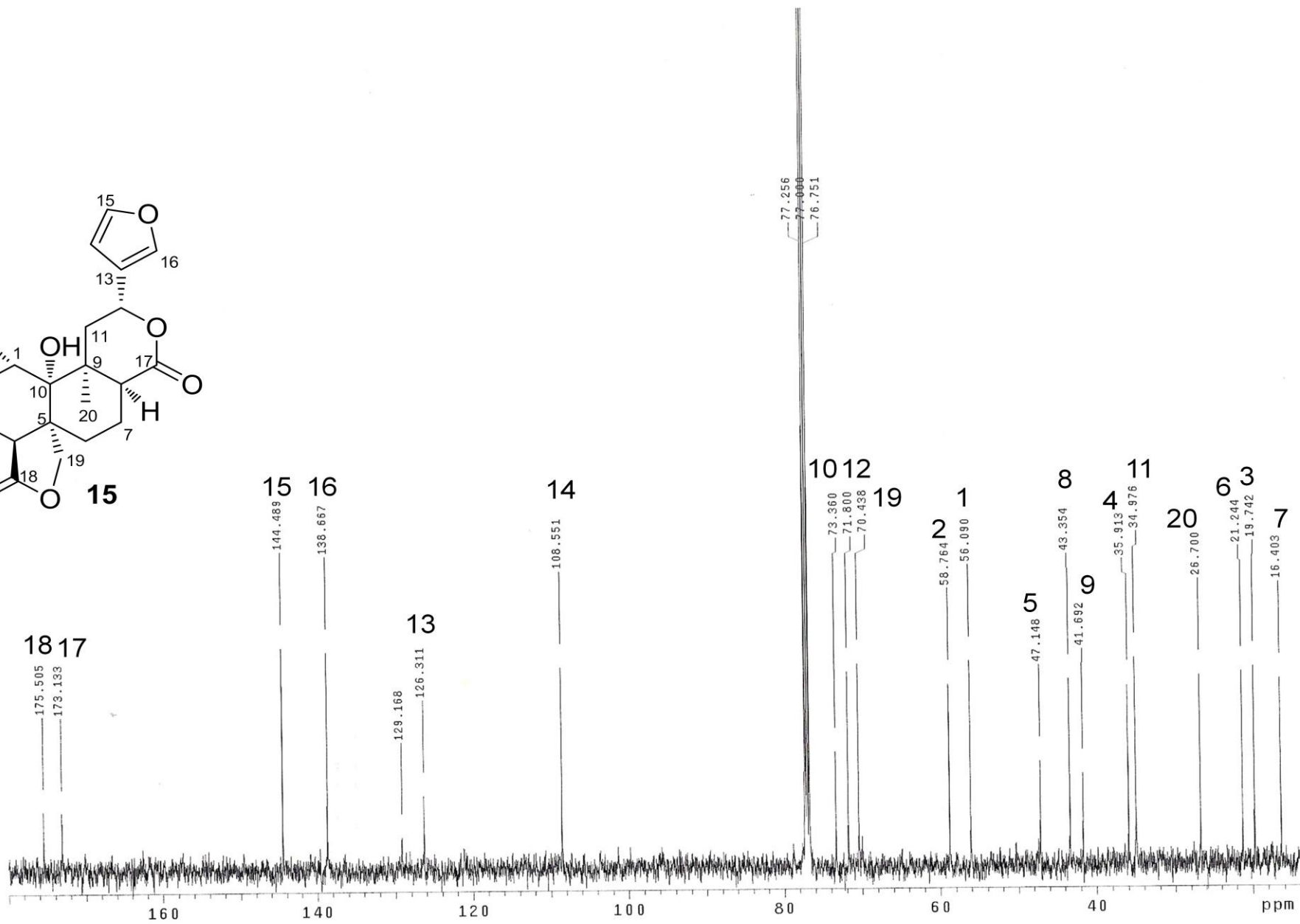
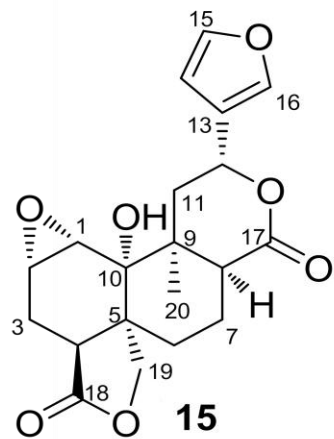
Espectro B-1: RMN de ¹H del compuesto **14** determinado en CDCl₃ + DMSO-d₆ a 500 MHz.



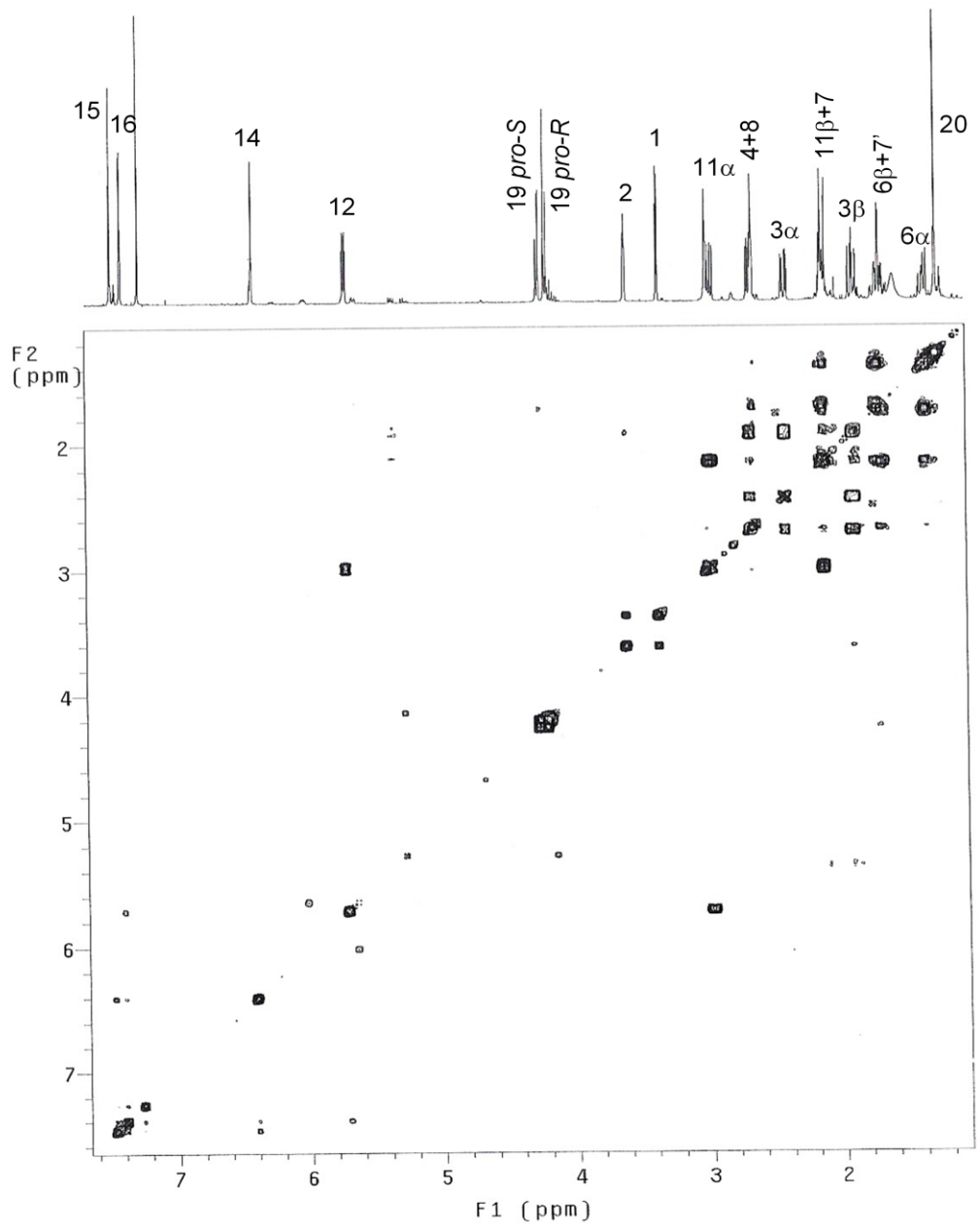
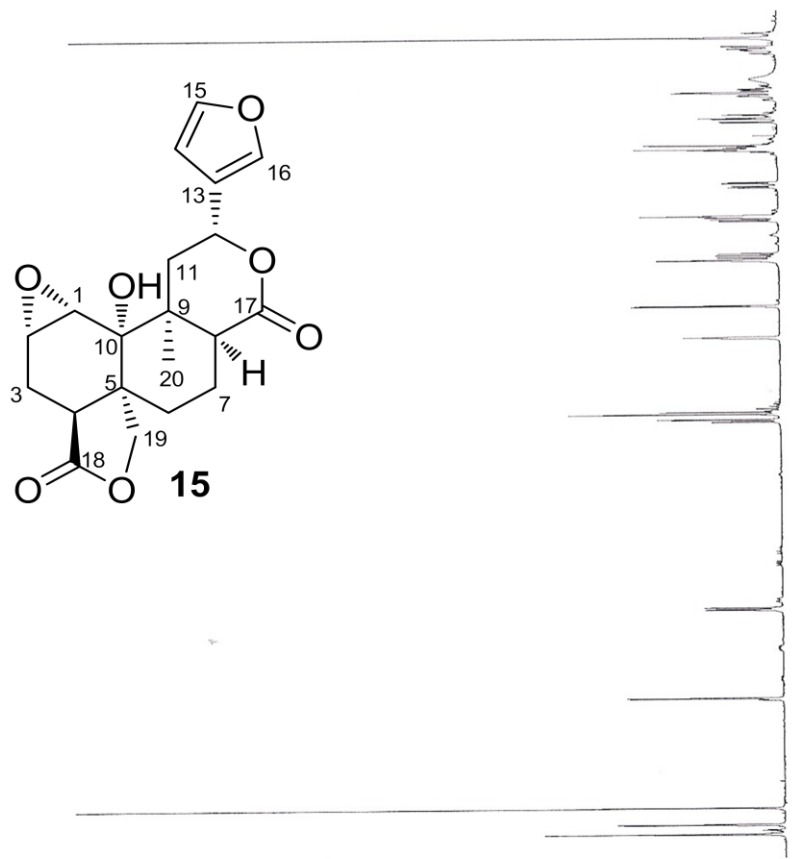
Espectro B-2: RMN de ^{13}C del compuesto **14** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$ a 125 MHz.



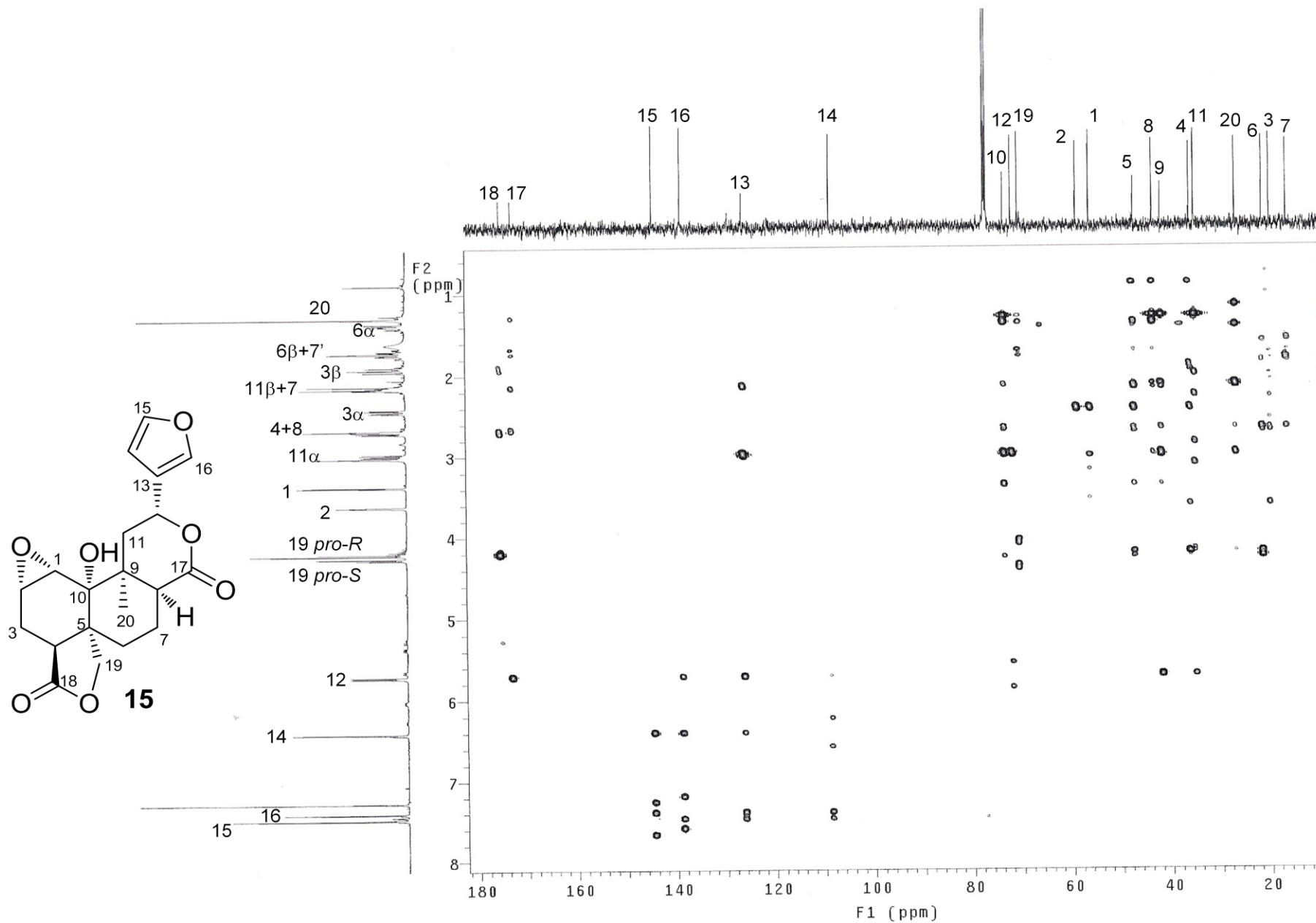
Espectro B-3: RMN de ¹H del compuesto **15** determinado en CDCl₃ a 500 MHz.



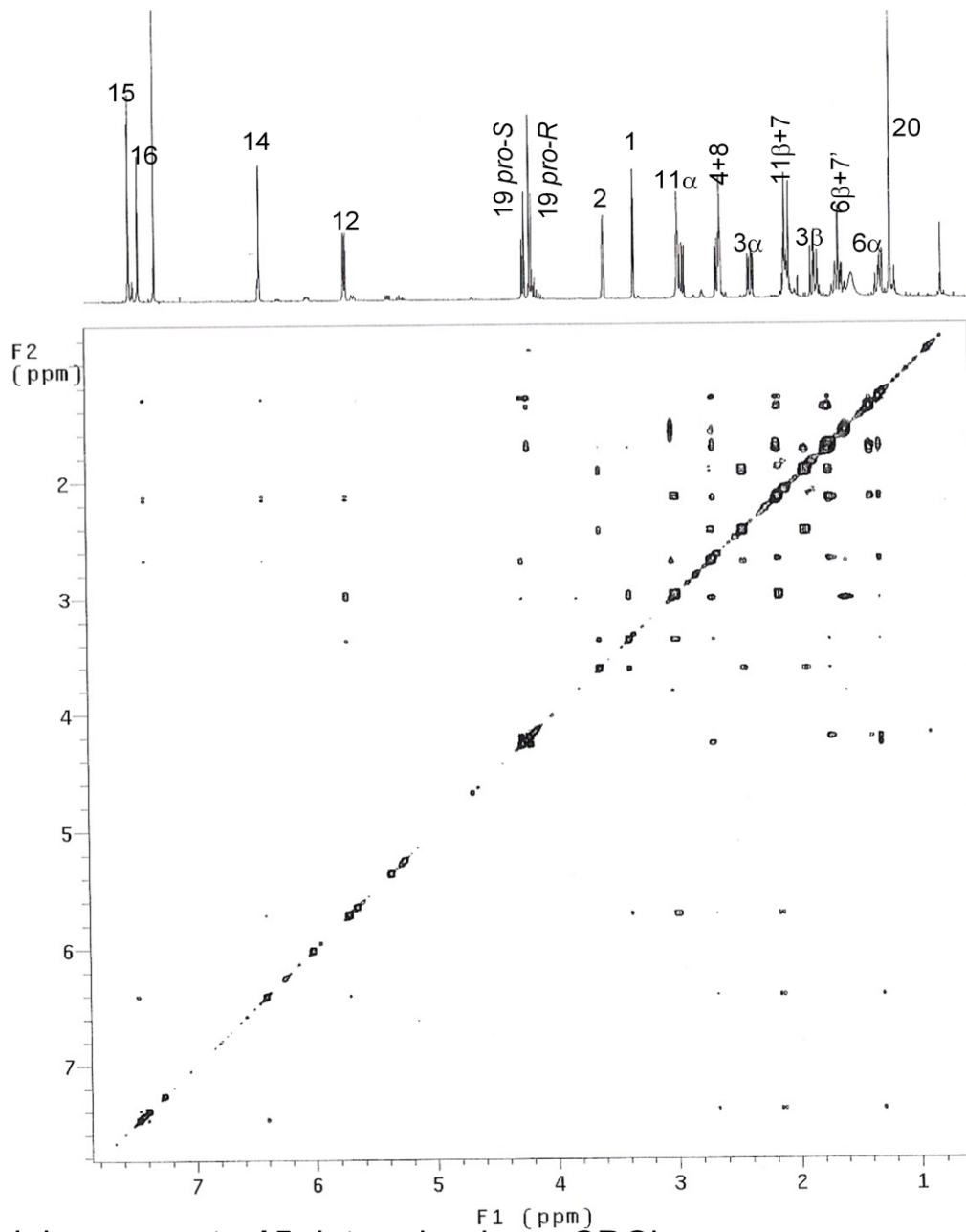
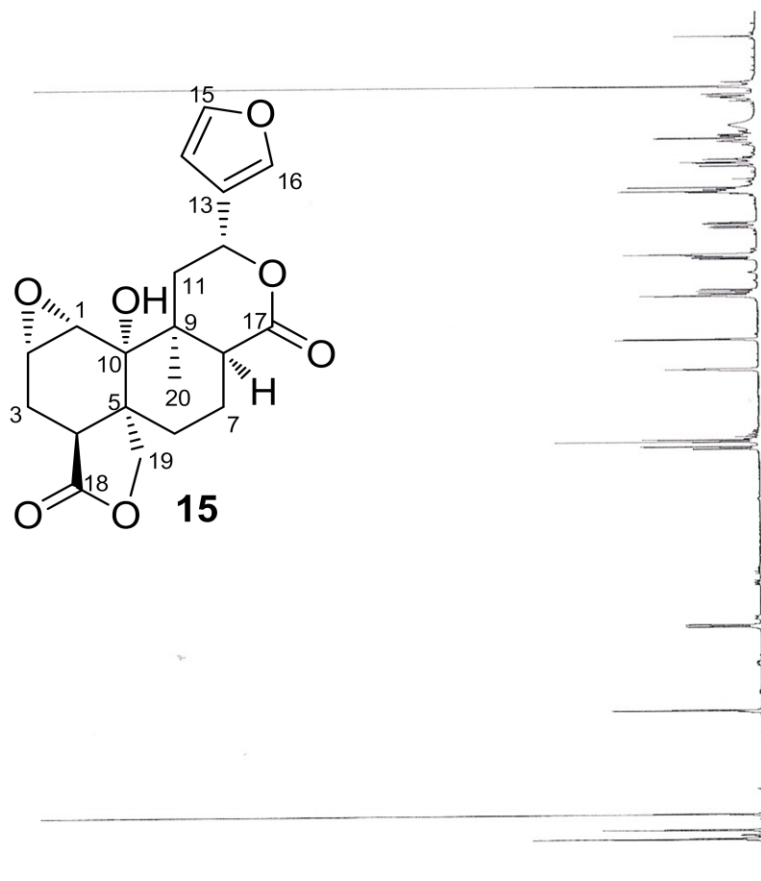
Espectro B-4: RMN de ^{13}C del compuesto **15** determinado en CDCl_3 a 125 MHz.



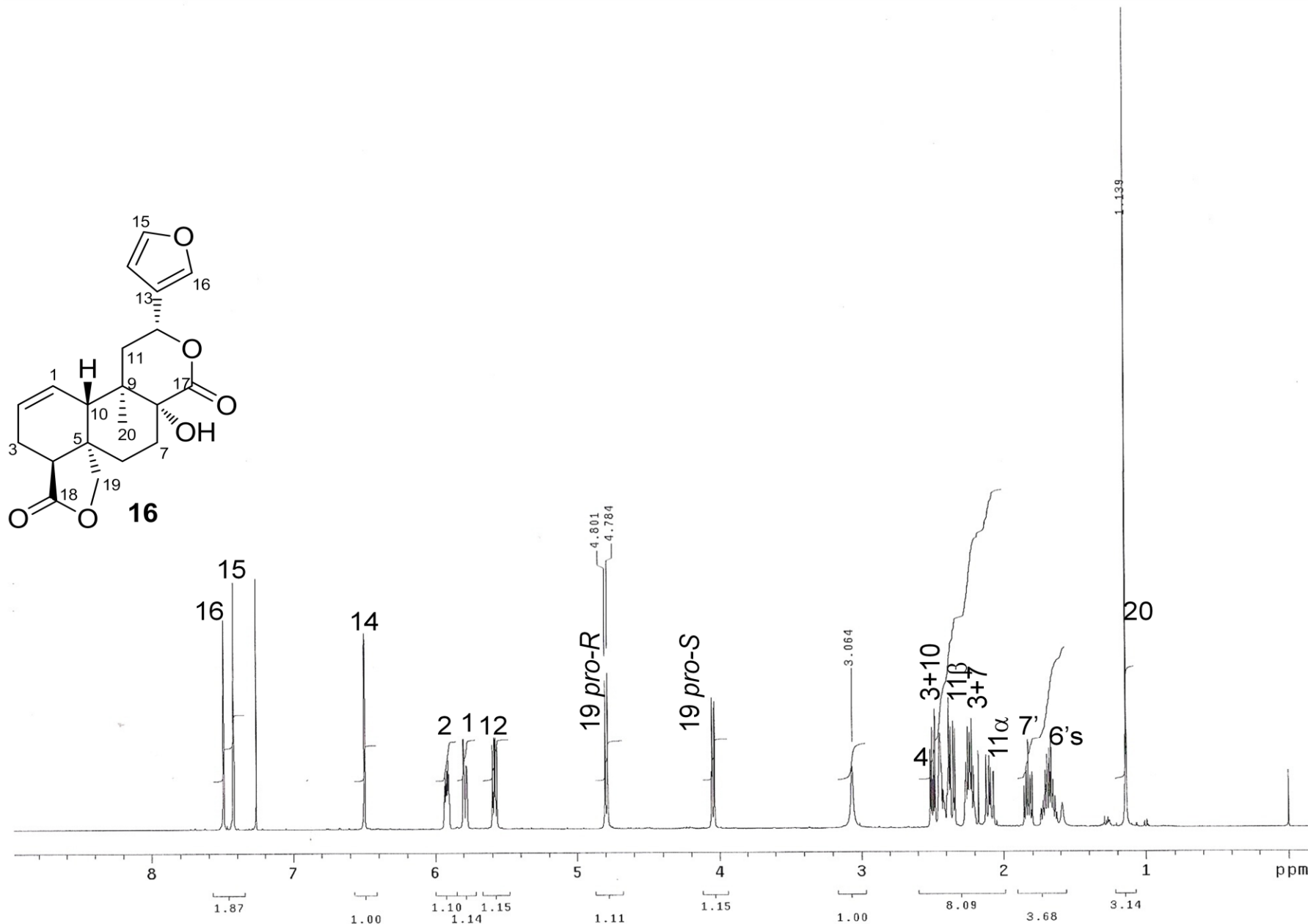
Espectro B-5: Experimento COSY del compuesto **15** determinado en CDCl₃.



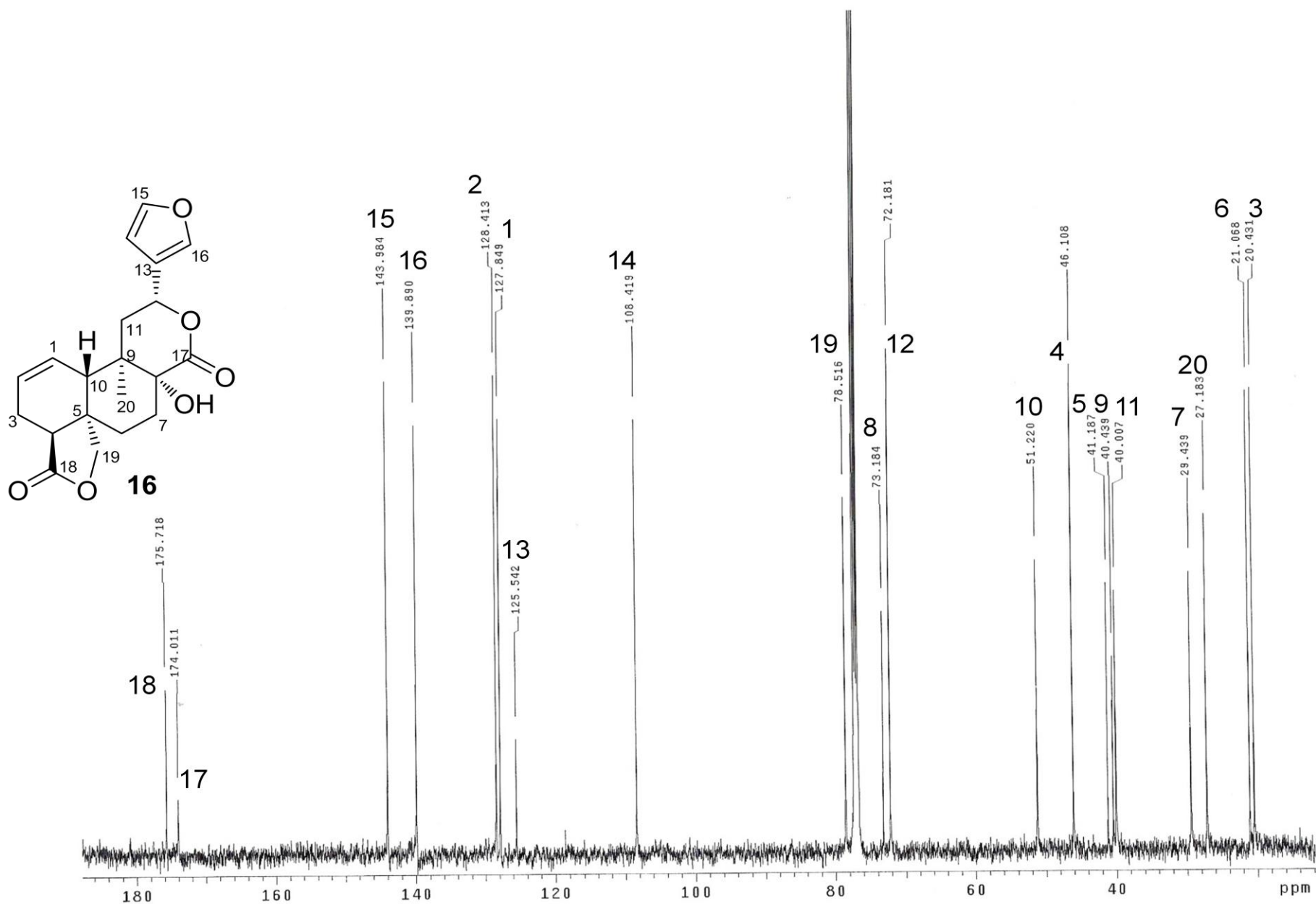
Espectro B-6: Experimento HMBC del compuesto **15** determinado en CDCl₃.



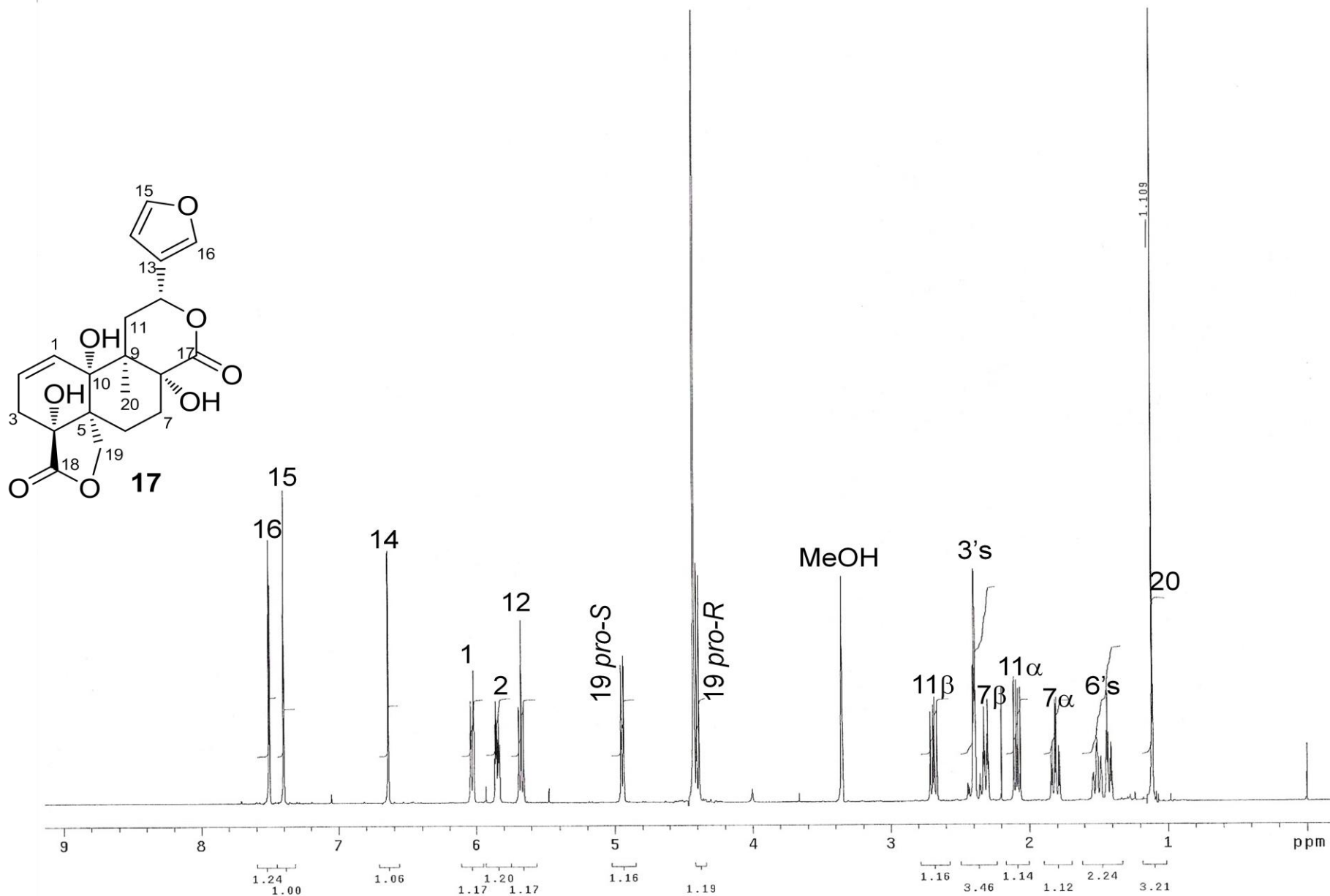
Espectro B-7: Experimento NOESY del compuesto **15** determinado en CDCl₃.



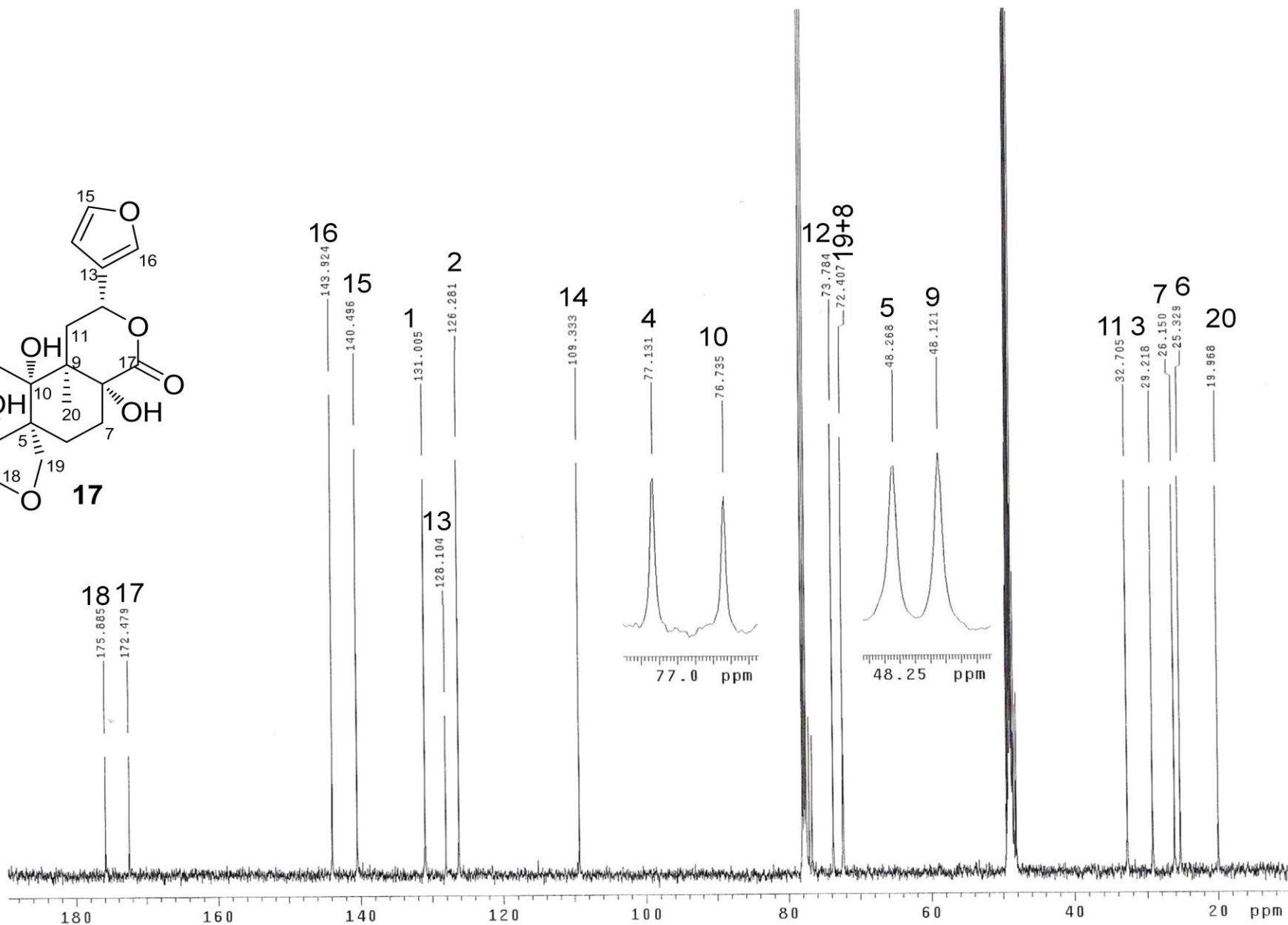
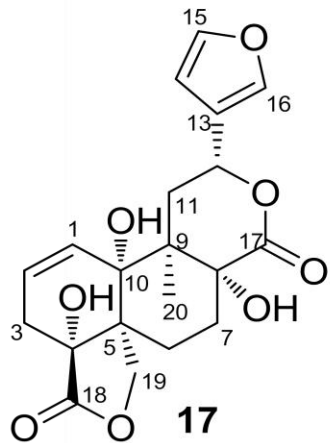
Espectro B-8: RMN de ^1H del compuesto **16** determinado en CDCl_3 a 500 MHz.



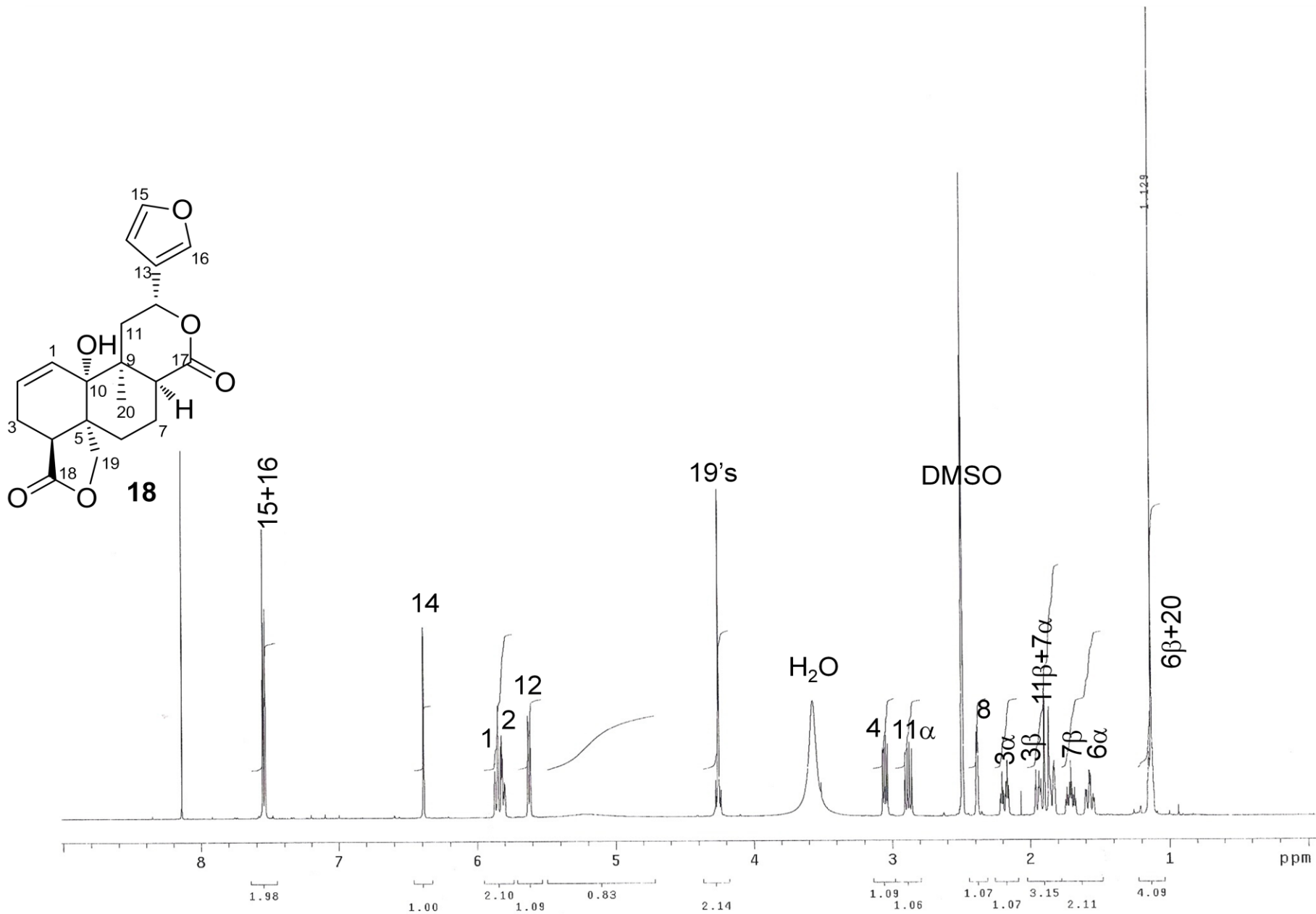
Espectro B-9: RMN de ¹³C del compuesto **16** determinado en CDCl₃ a 125 MHz.



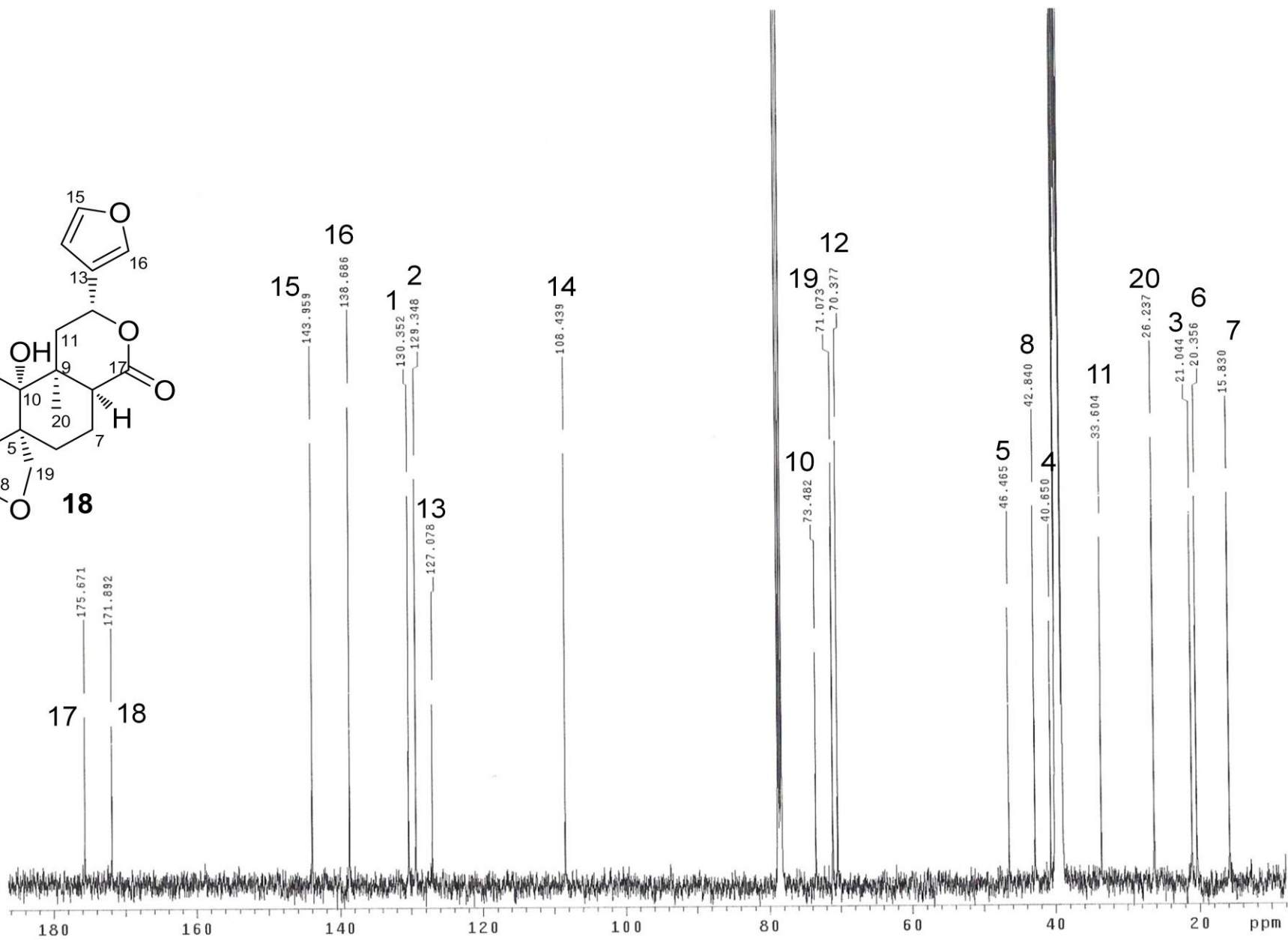
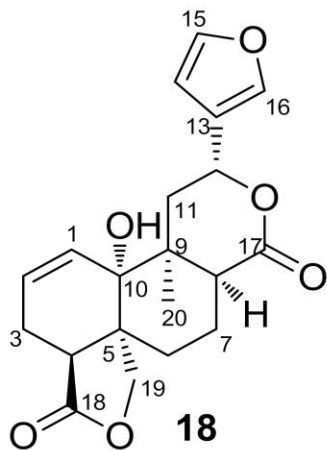
Espectro B-10: RMN de ^1H del compuesto **17** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ a 500 MHz.



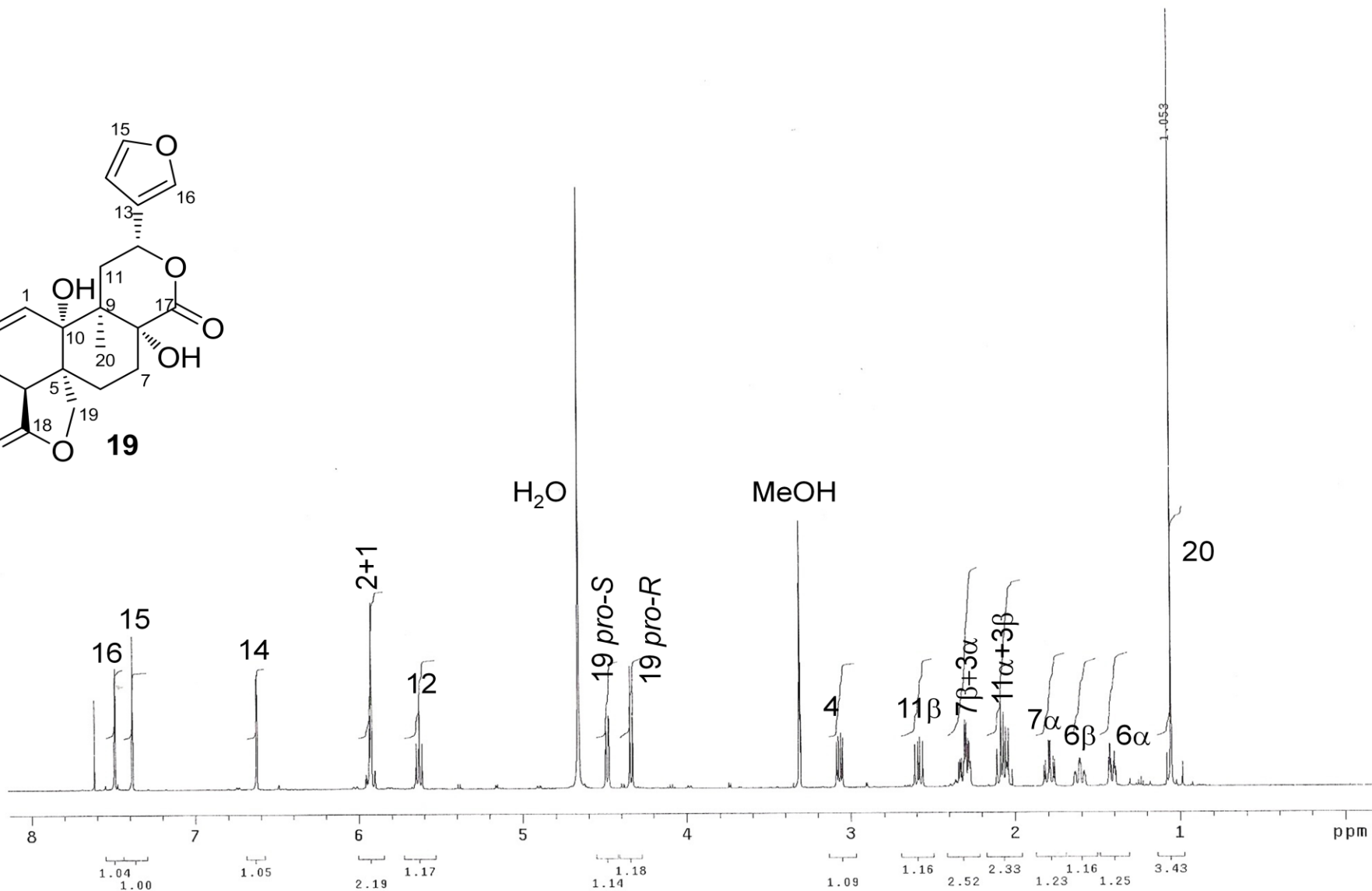
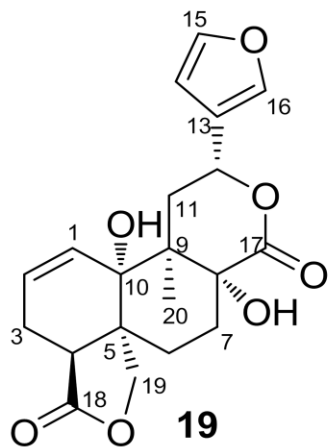
Espectro B-11: RMN de ^{13}C del compuesto **17** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ a 125 MHz.



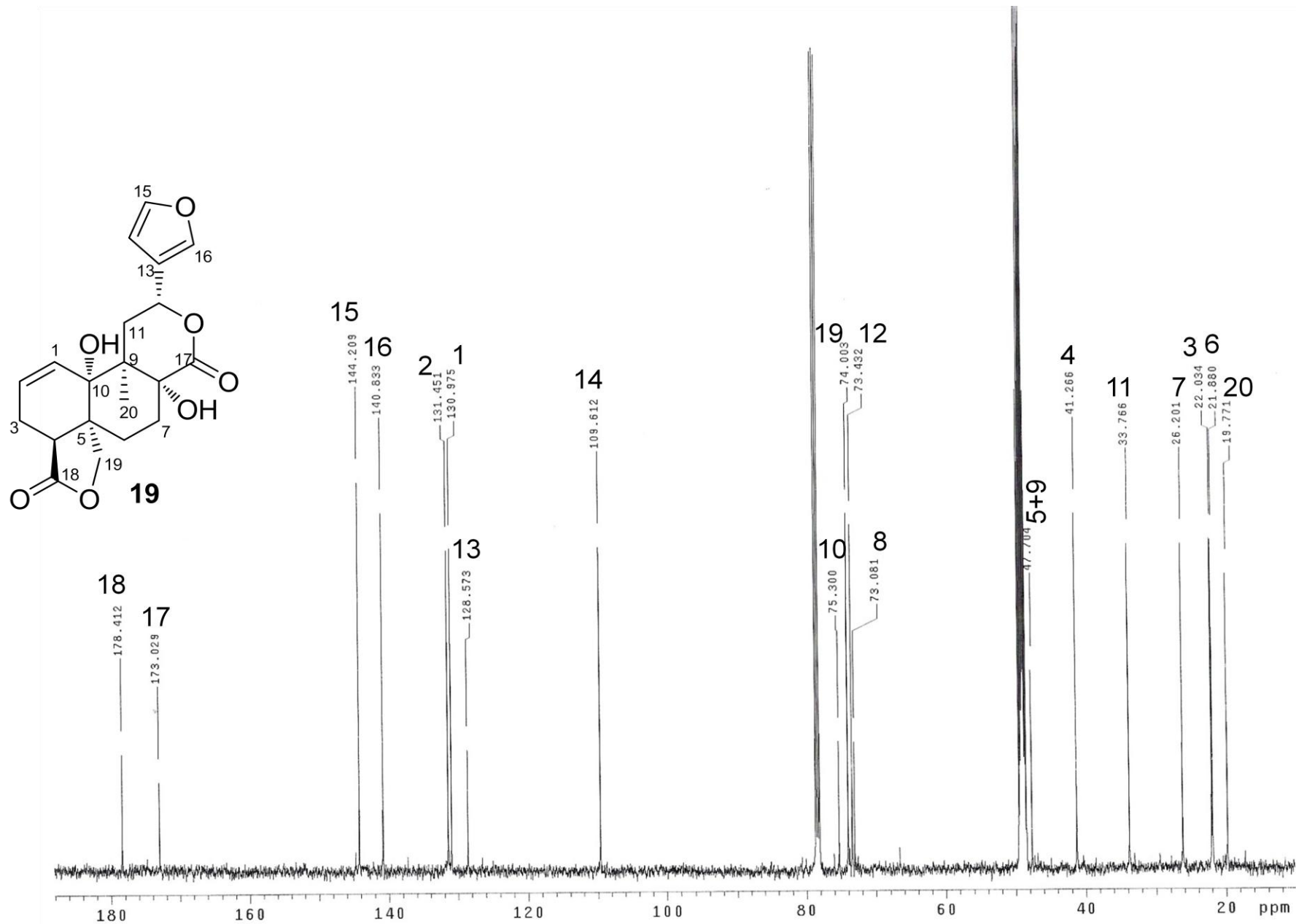
Espectro B-12: RMN de ¹H del compuesto **18** determinado en CDCl₃+DMSO-d₆ a 500 MHz.



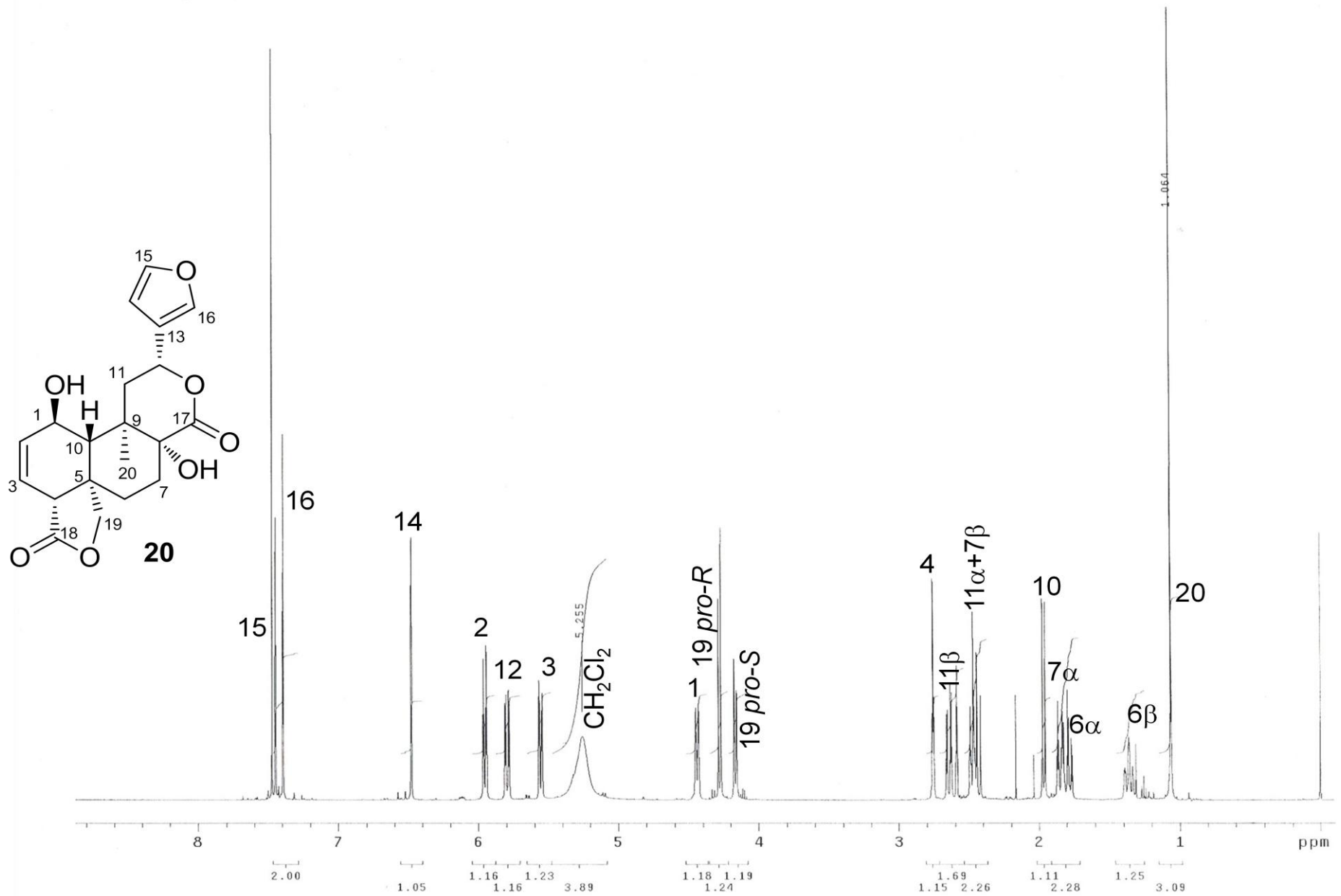
Espectro B-13: RMN de ^{13}C del compuesto **18** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$ a 125 MHz.



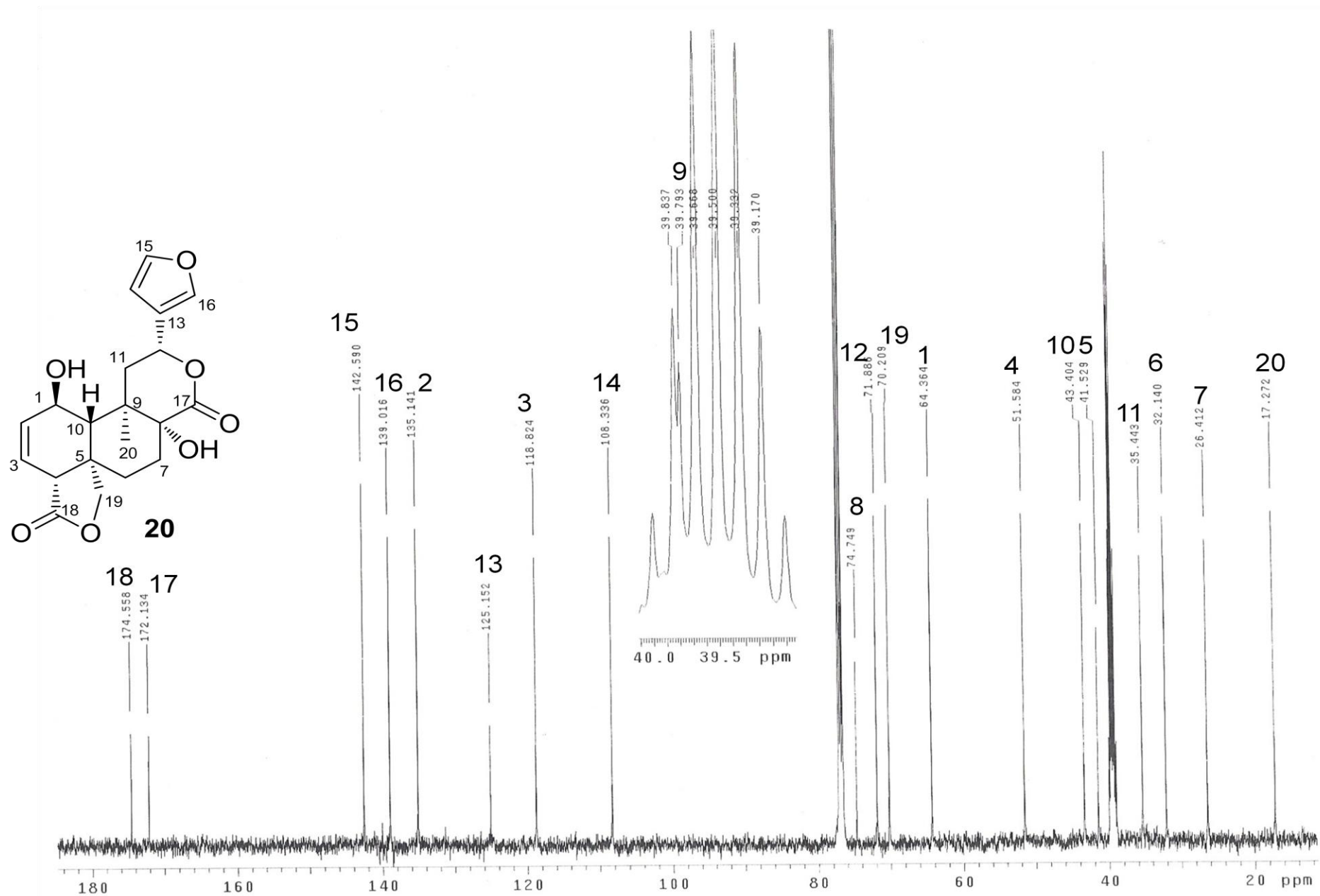
Espectro B-14: RMN de ^1H del compuesto **19** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ a 500 MHz.



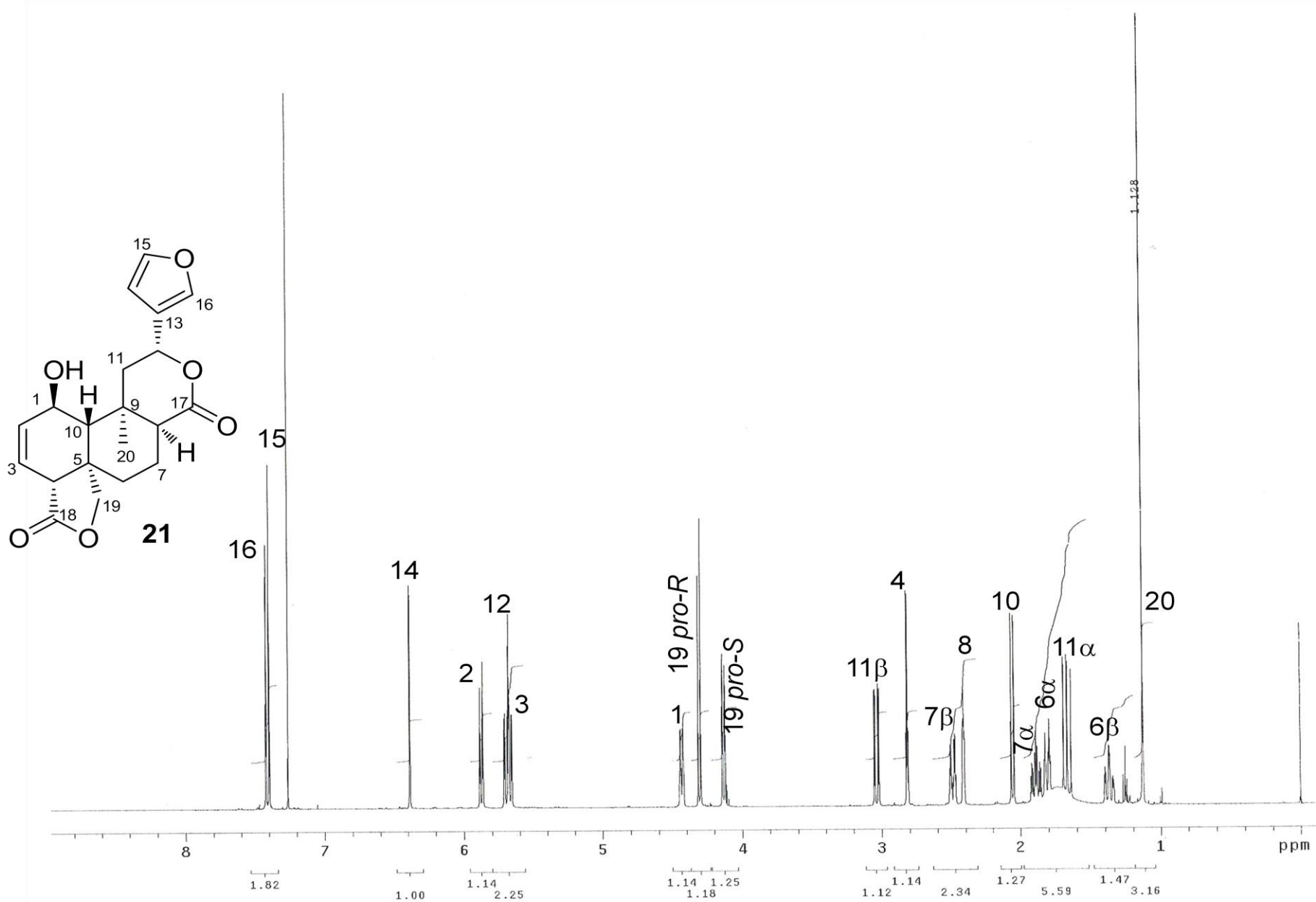
Espectro B-15: RMN de ¹³C del compuesto **19** determinado en CDCl₃+CD₃OD a 125 MHz.



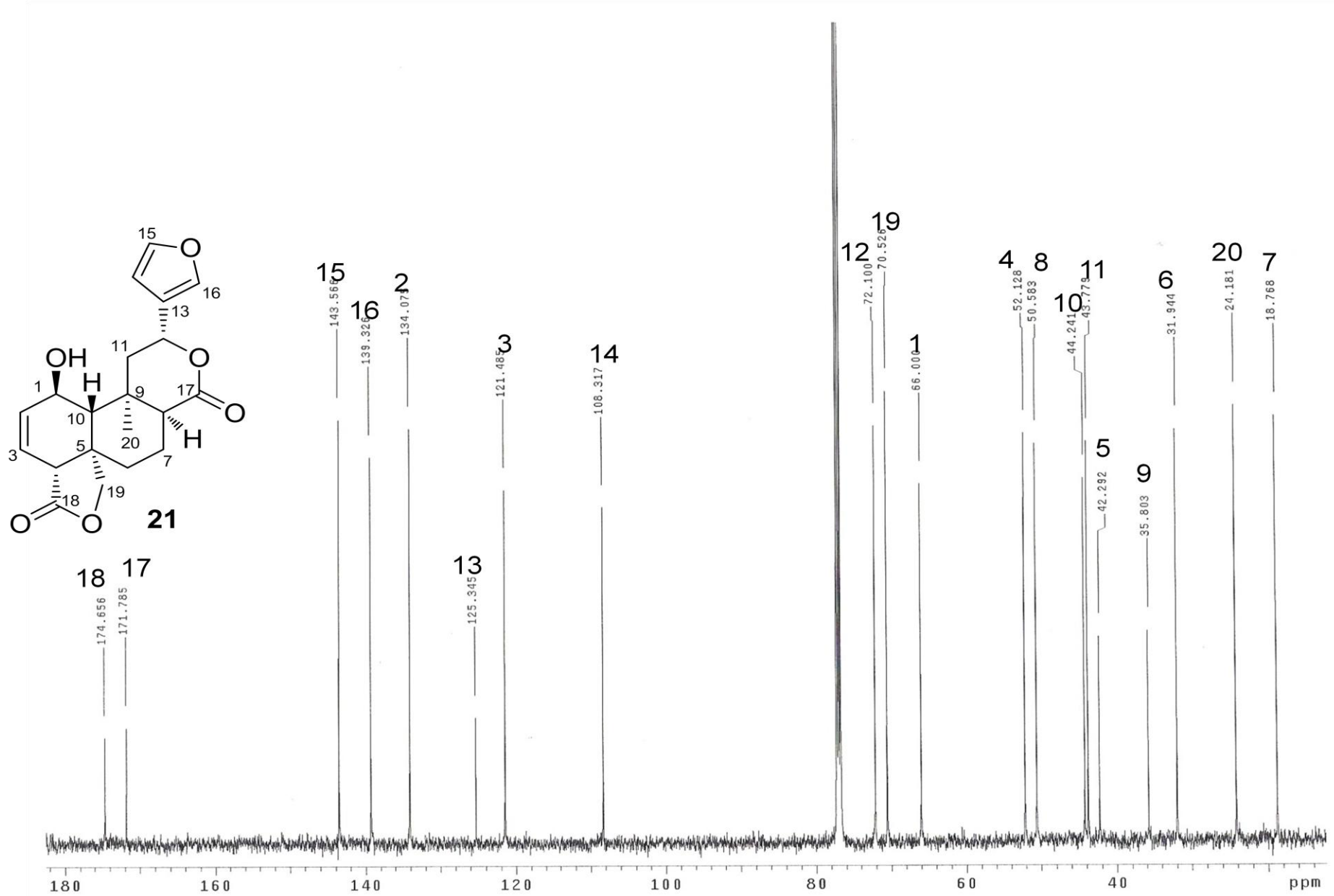
Espectro B-16: RMN de ¹H del compuesto **20** determinado en CDCl₃+DMSO-d₆ a 500 MHz.



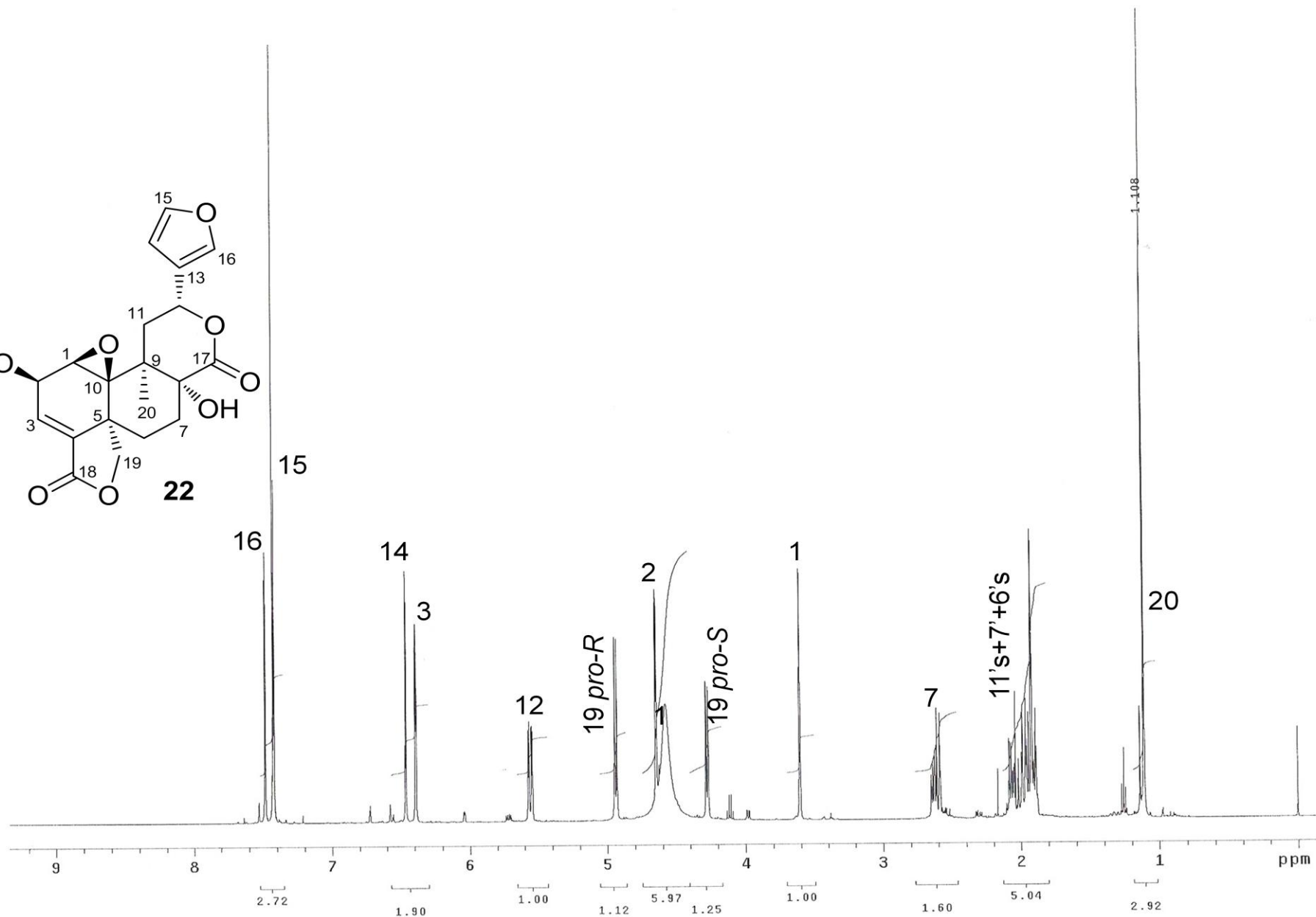
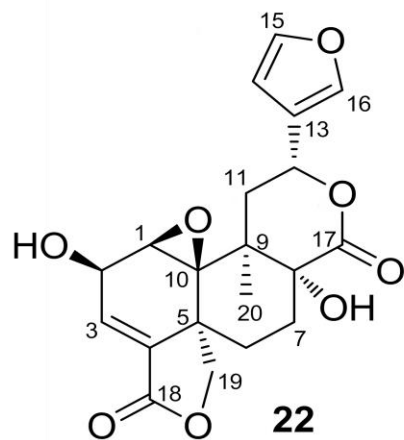
Espectro B-17: RMN de ¹³C del compuesto **20** determinado en CDCl₃+DMSO-d₆ a 125 MHz.



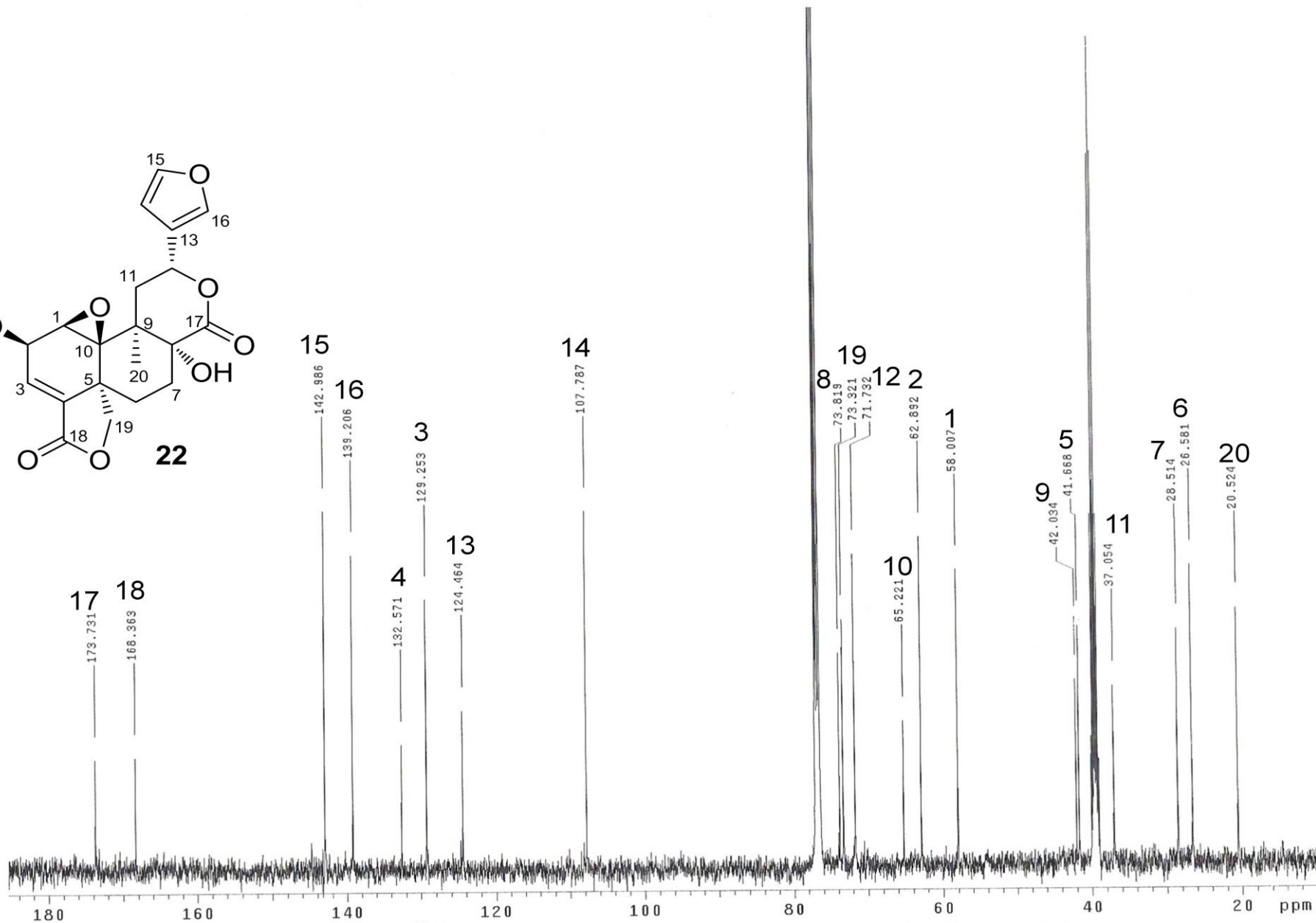
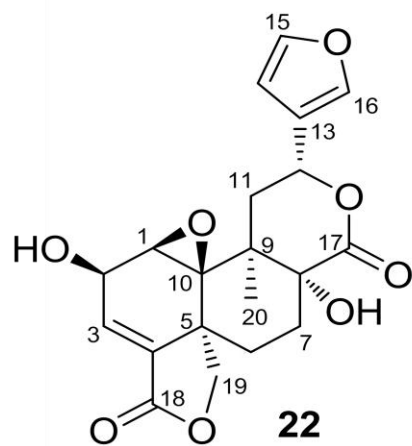
Espectro B-18: RMN de ¹H del compuesto **21** determinado en CDCl₃ a 500 MHz.



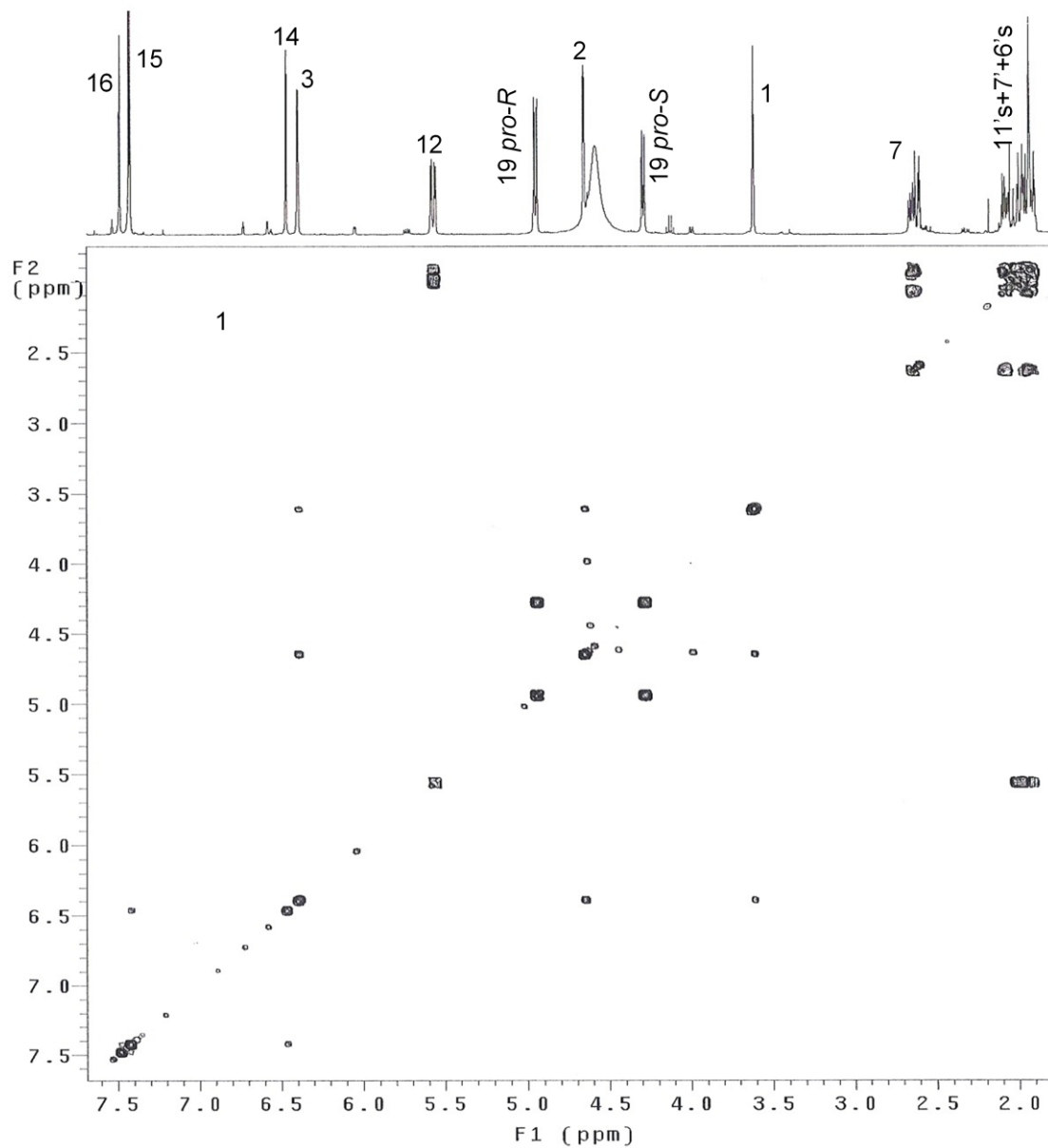
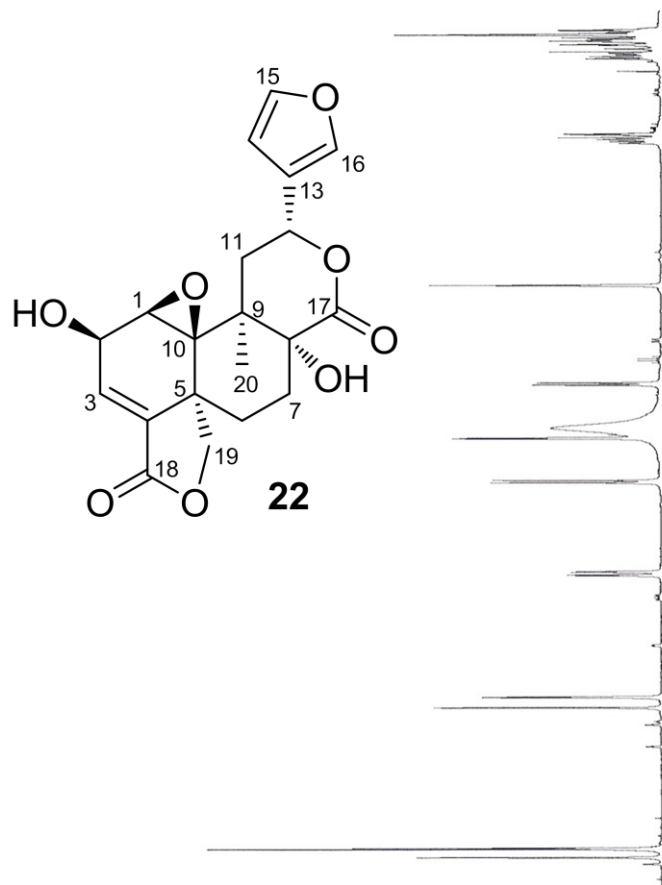
Espectro B-19: RMN de ¹³C del compuesto **21** determinado en CDCl₃ a 125 MHz.



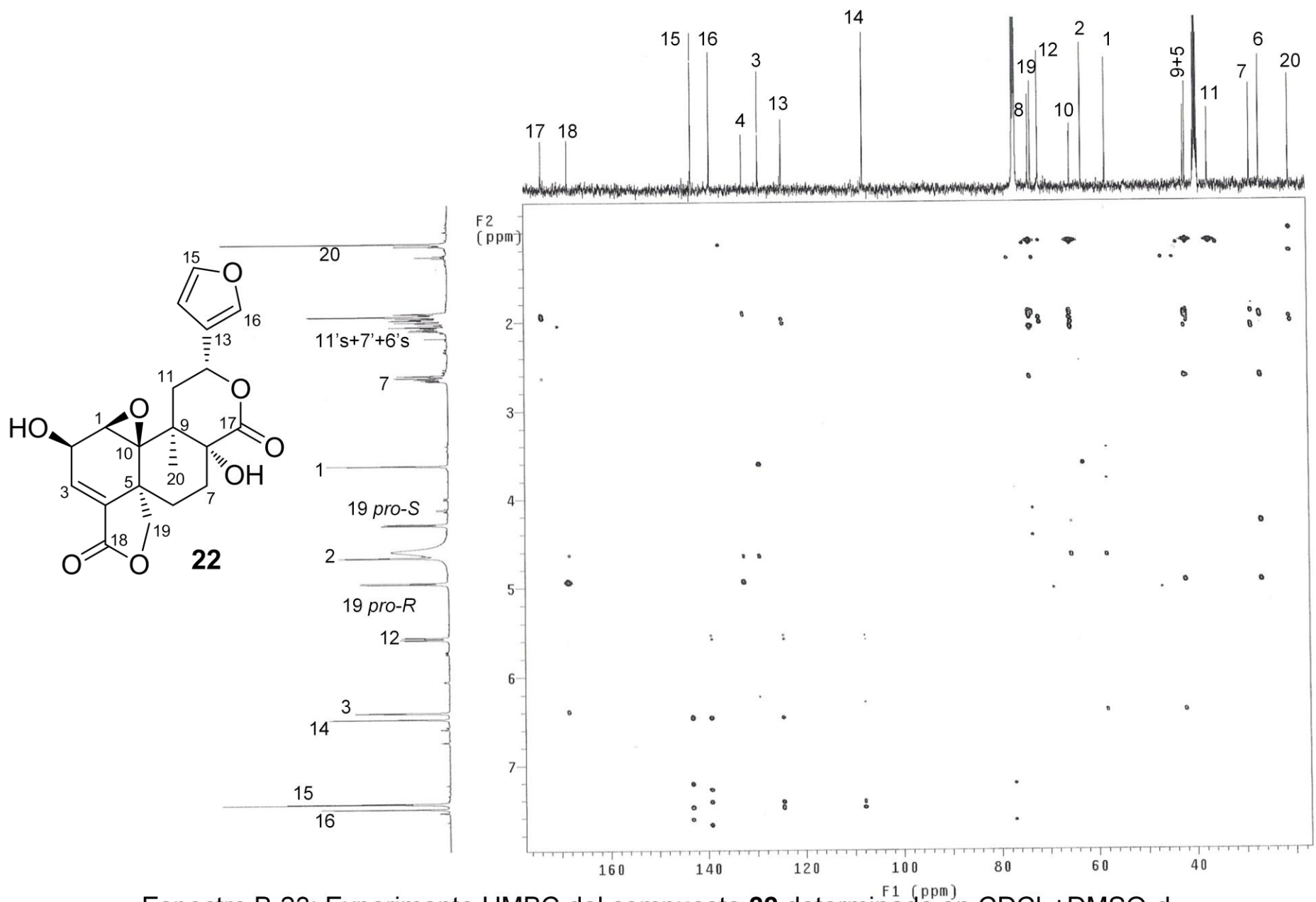
Espectro B-20: RMN de ¹H del compuesto **22** determinado en CDCl₃+DMSO-d₆ a 500 MHz.



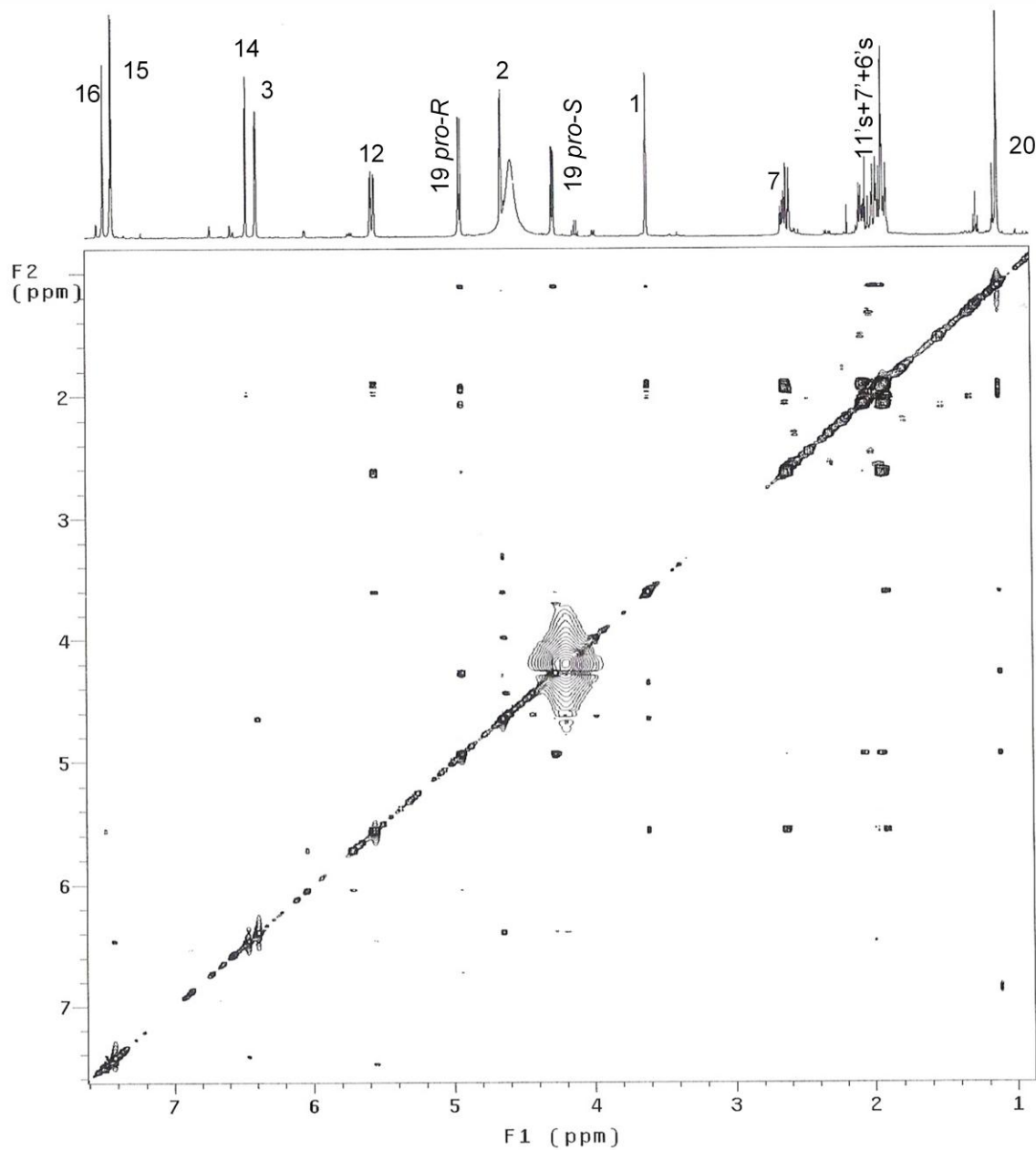
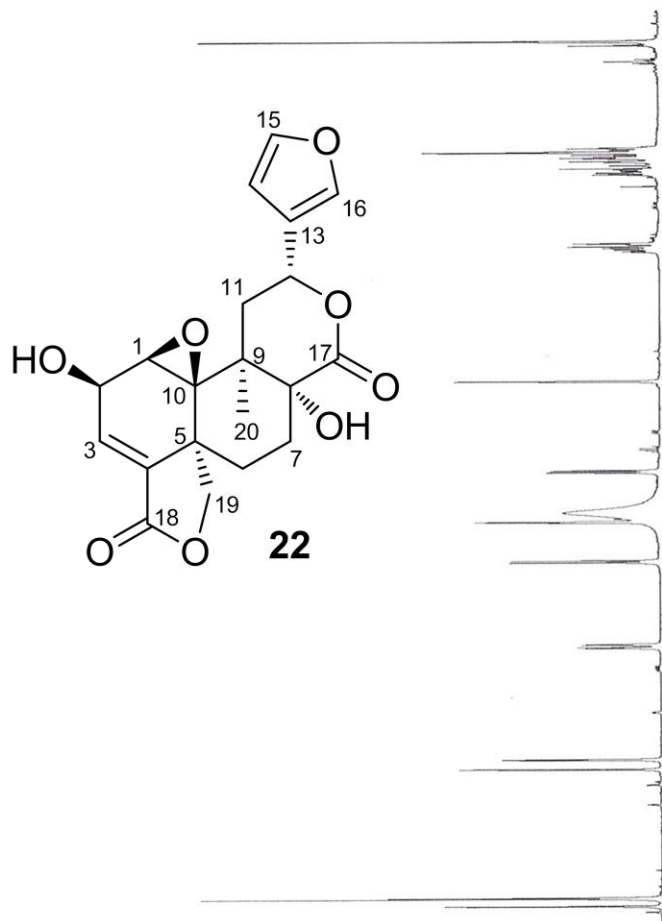
Espectro B-21: RMN de ^{13}C del compuesto **22** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$ a 125 MHz.



Espectro B-22: Experimento COSY del compuesto **22** determinado en $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$.



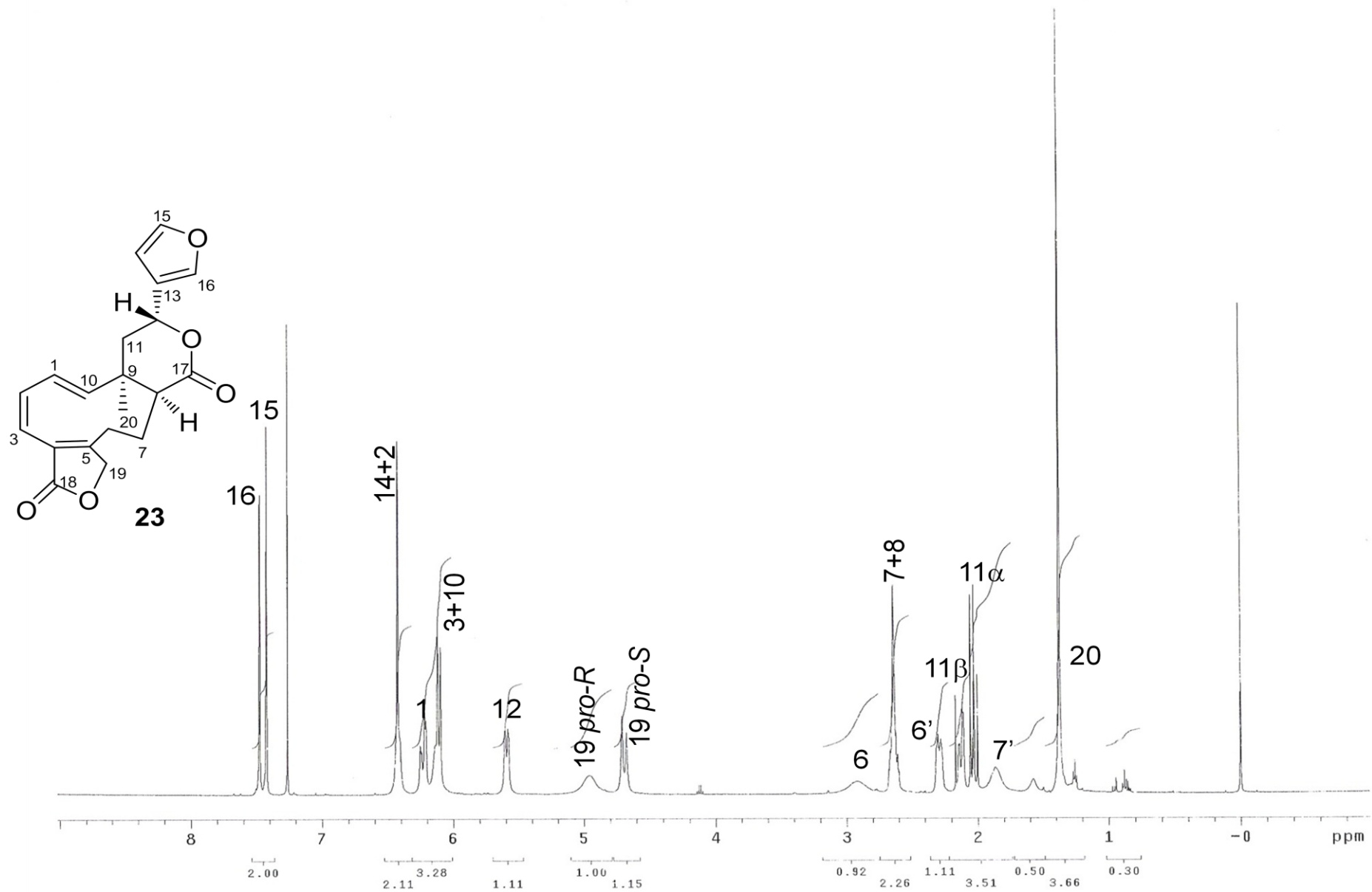
Espectro B-23: Experimento HMBC del compuesto **22** determinado en CDCl₃+DMSO-d₆.



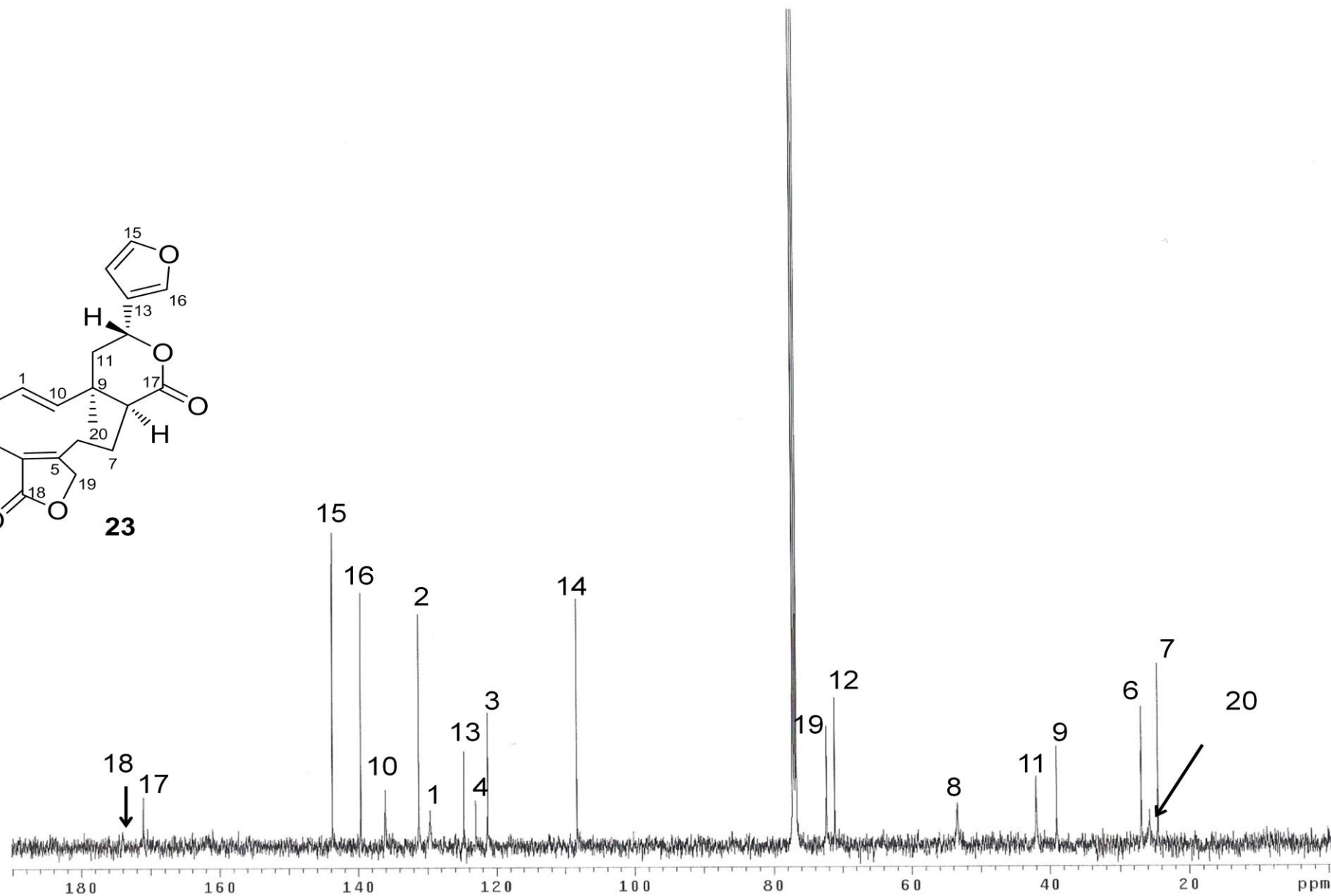
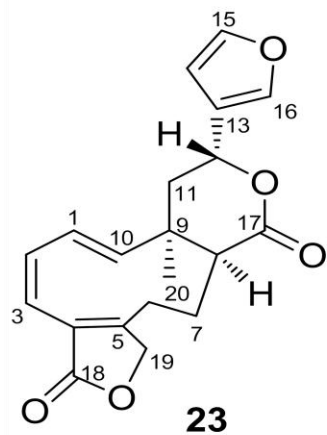
Espectro B-24: Experimento NOESY del compuesto **22** determinado en CDCl₃+DMSO-d₆.

Apéndice C

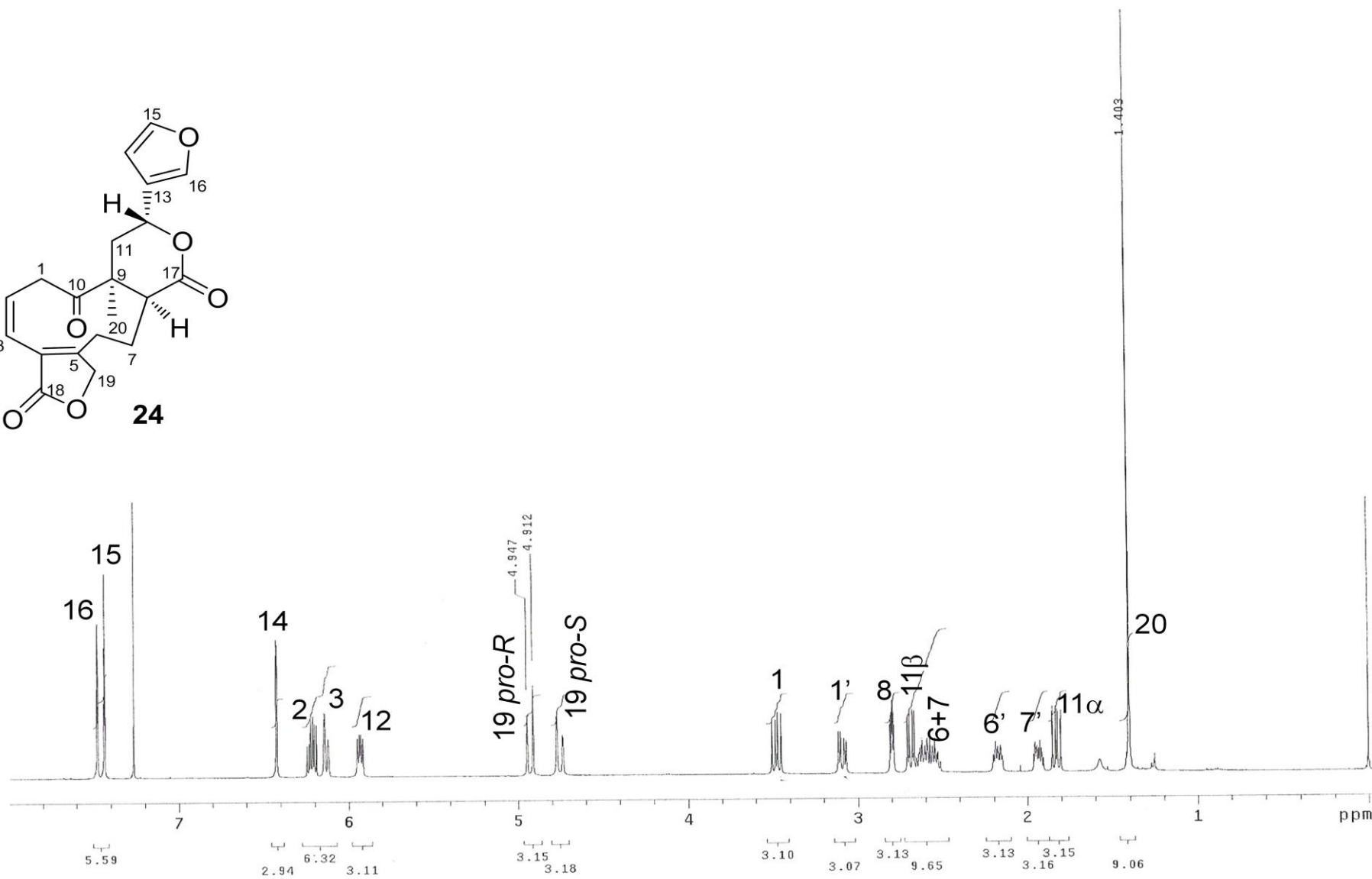
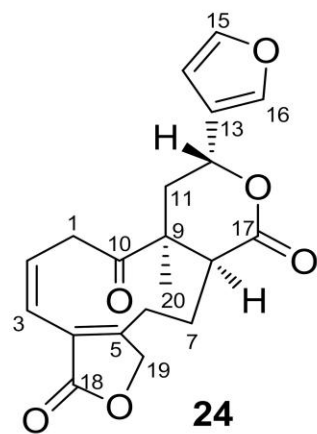
Espectros de RMN de los compuestos aislados de *Salvia microphylla*



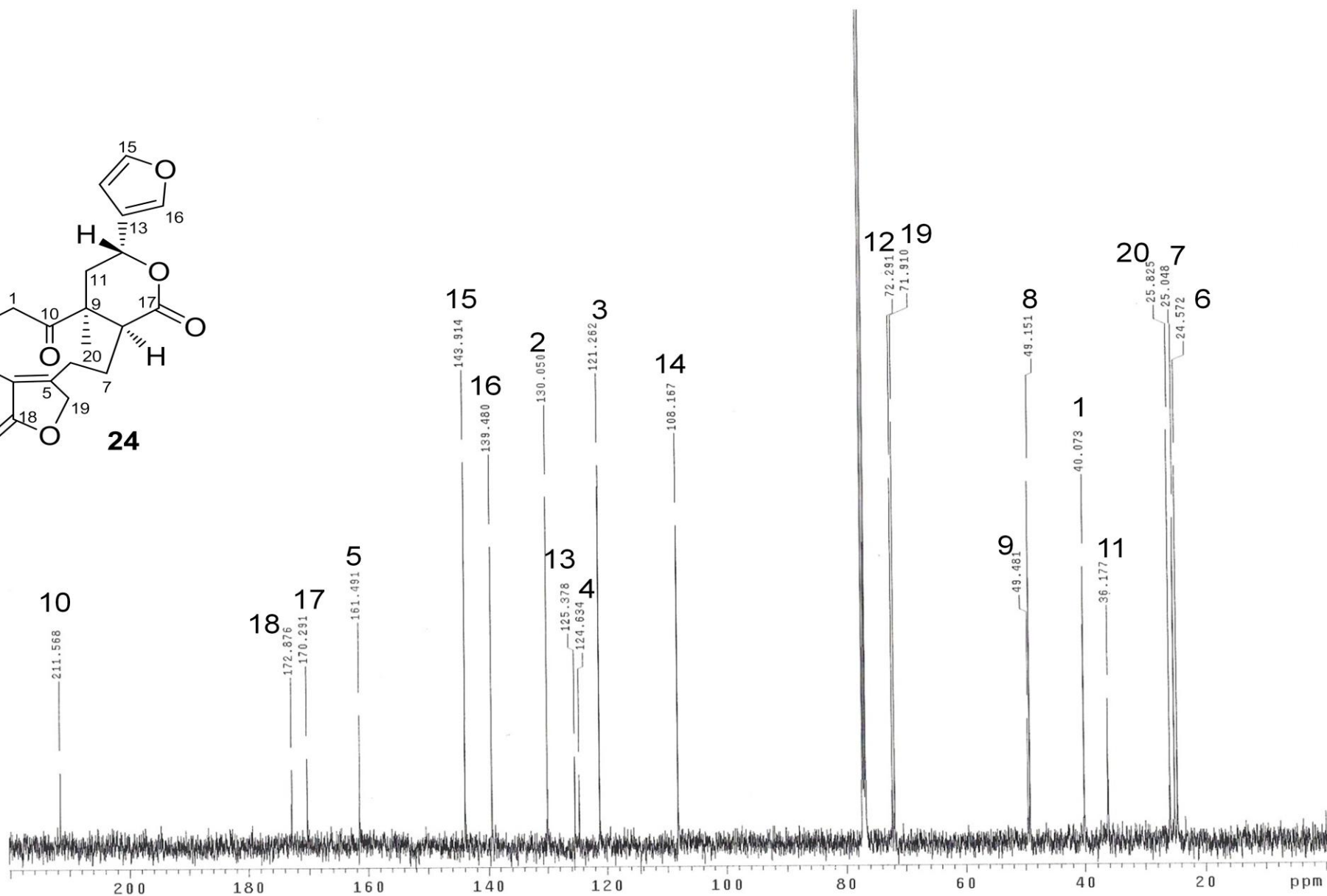
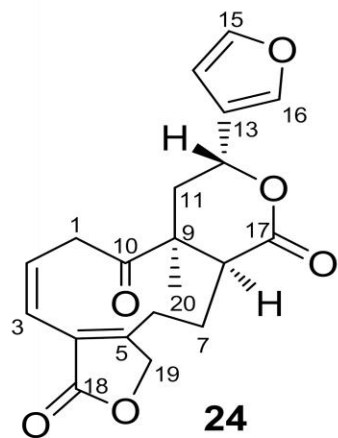
Espectro C-1: RMN de ¹H del compuesto **23** determinado en CDCl₃ a 500 MHz.



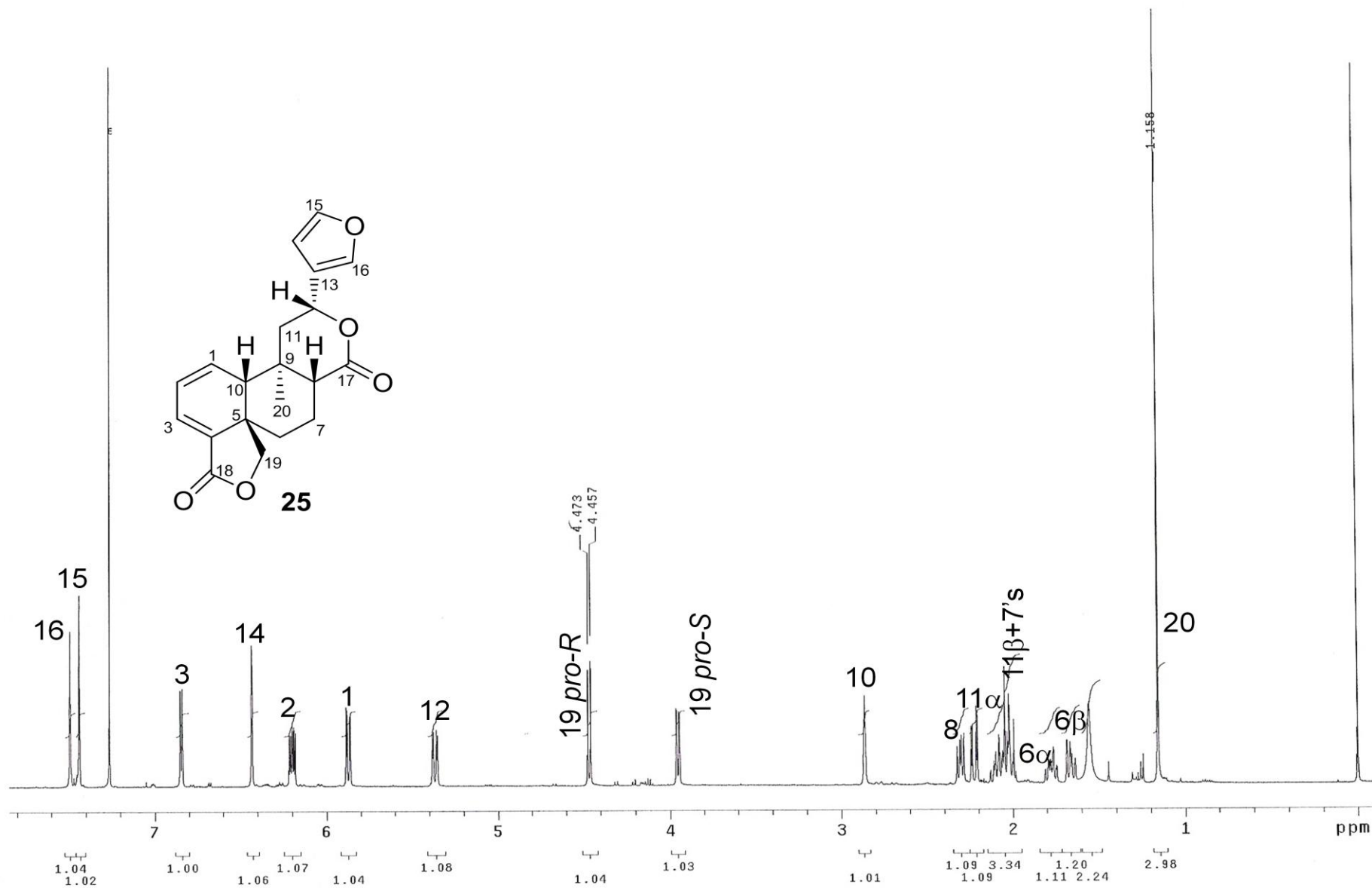
Espectro C-2: RMN de ^{13}C del compuesto **23** determinado en CDCl_3 a 125 MHz.



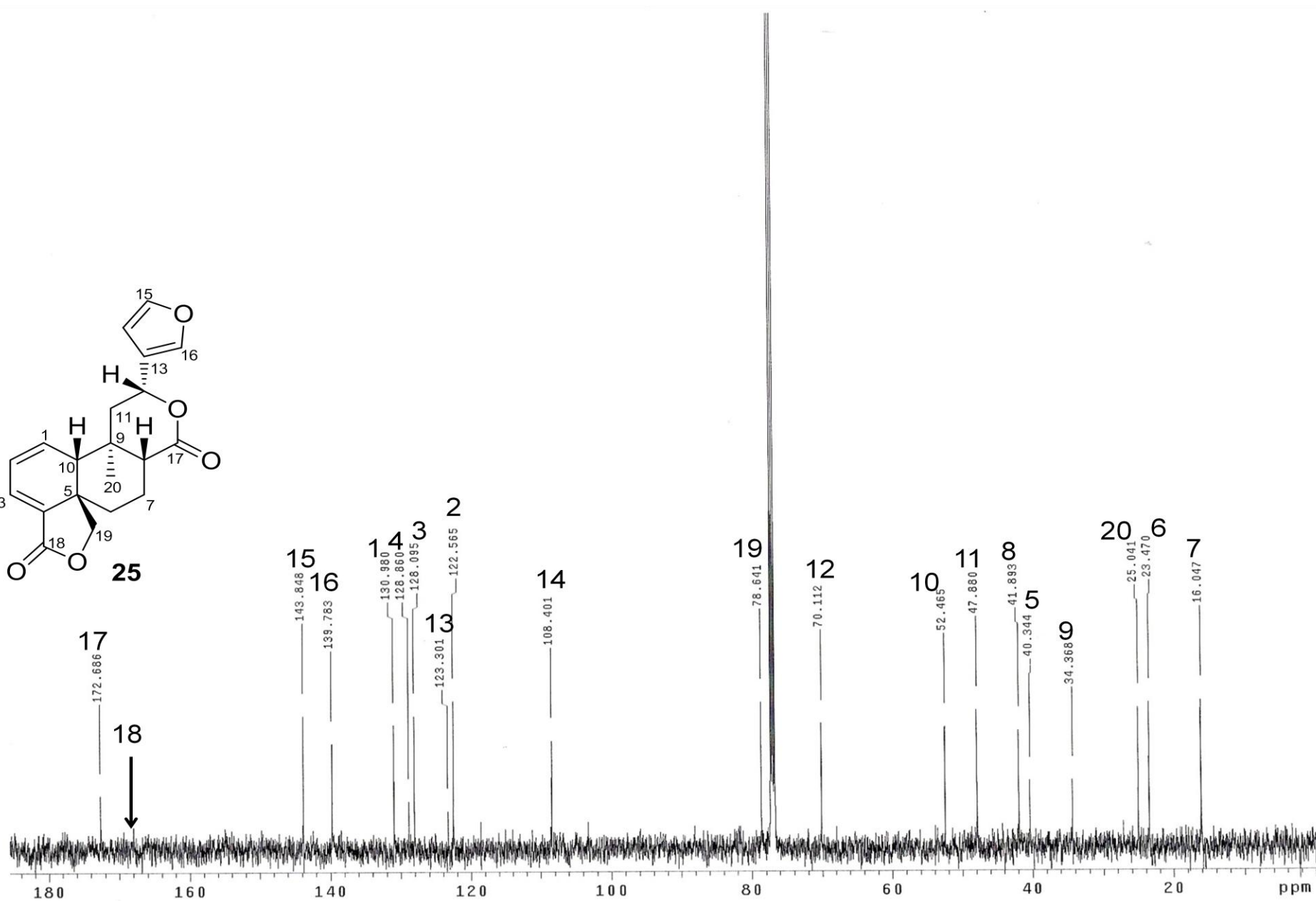
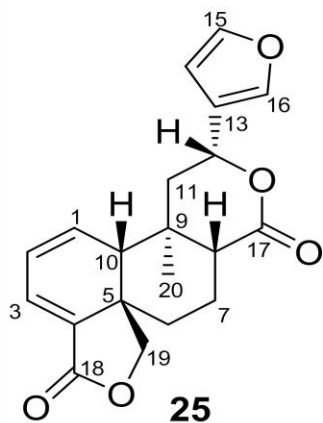
Espectro C-3: RMN de ^1H del compuesto **24** determinado en CDCl_3 a 500 MHz.



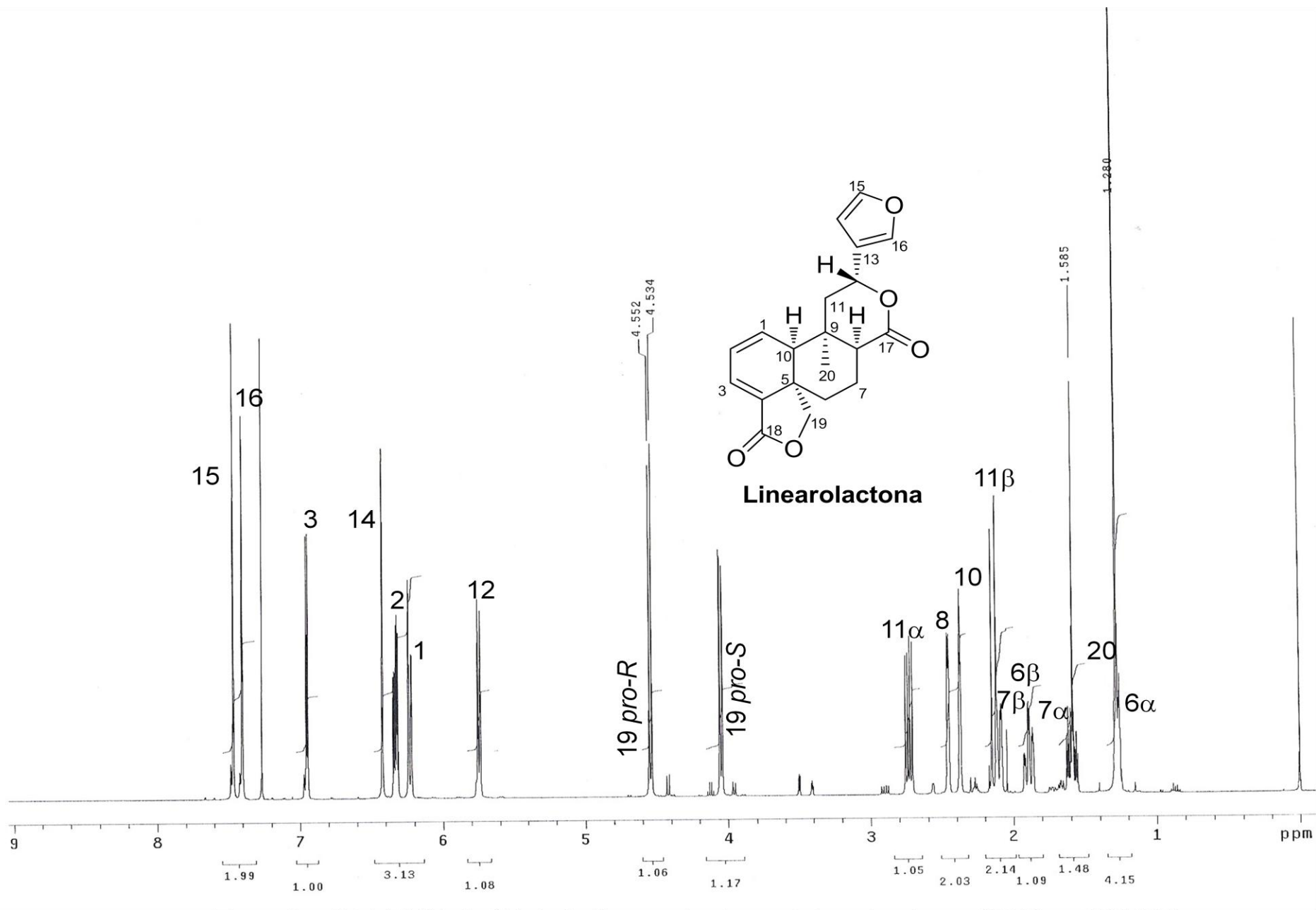
Espectro C-4: RMN de ^{13}C del compuesto **24** determinado en CDCl_3 a 125 MHz.



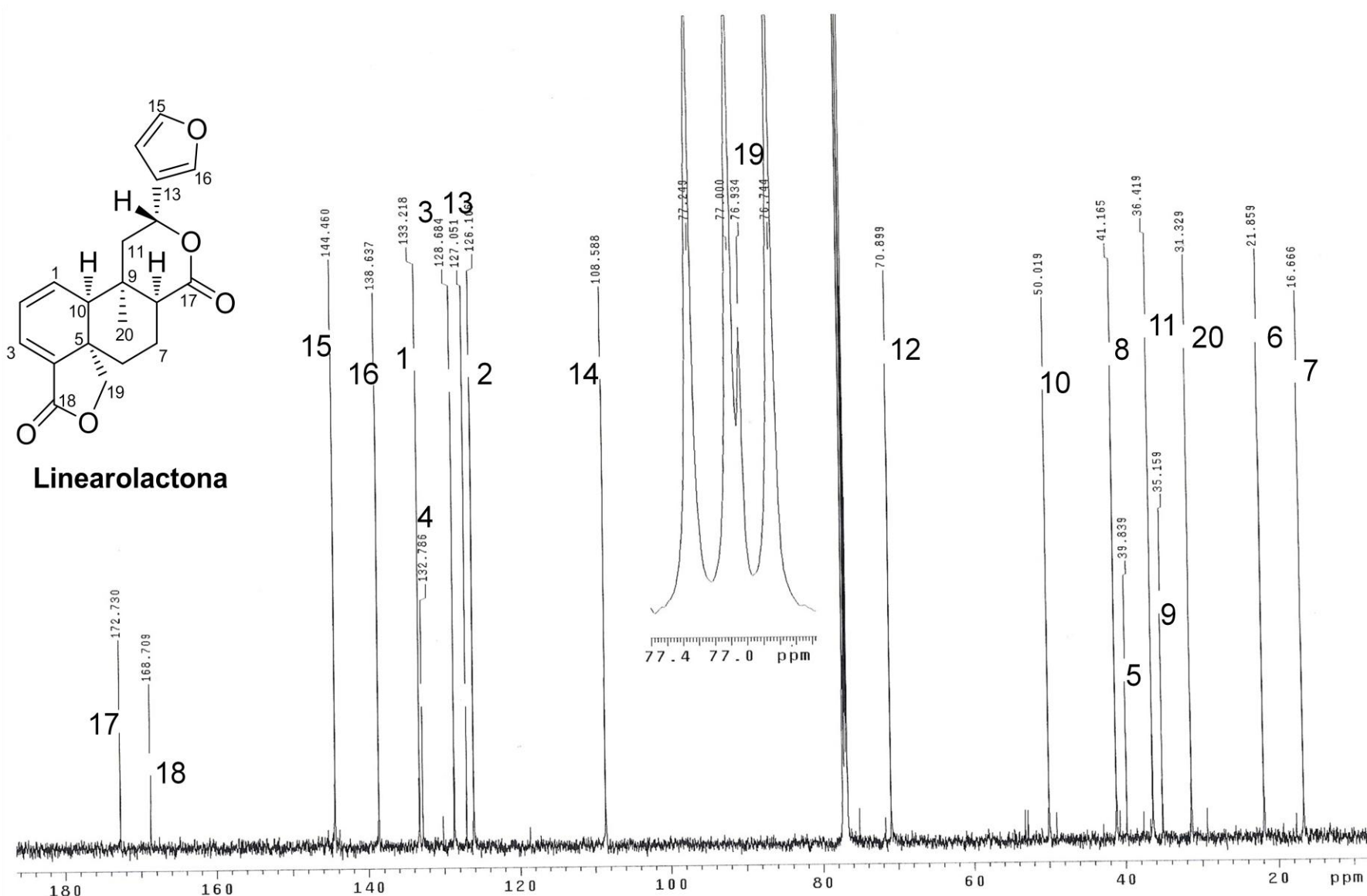
Espectro C-5: RMN de ^1H del compuesto **25** determinado en CDCl_3 a 500 MHz.



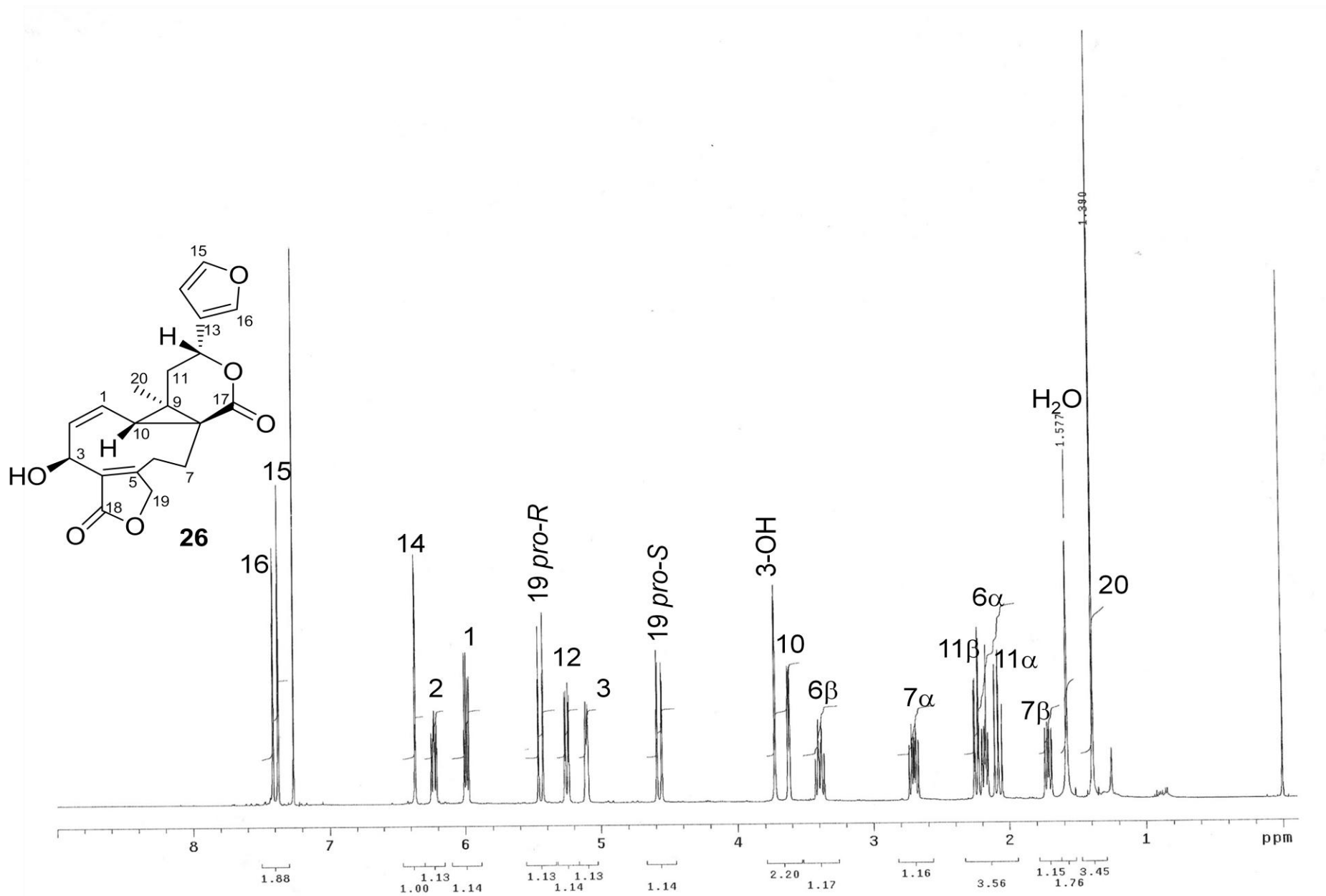
Espectro C-6: RMN de ^{13}C del compuesto **25** determinado en CDCl_3 a 125 MHz.



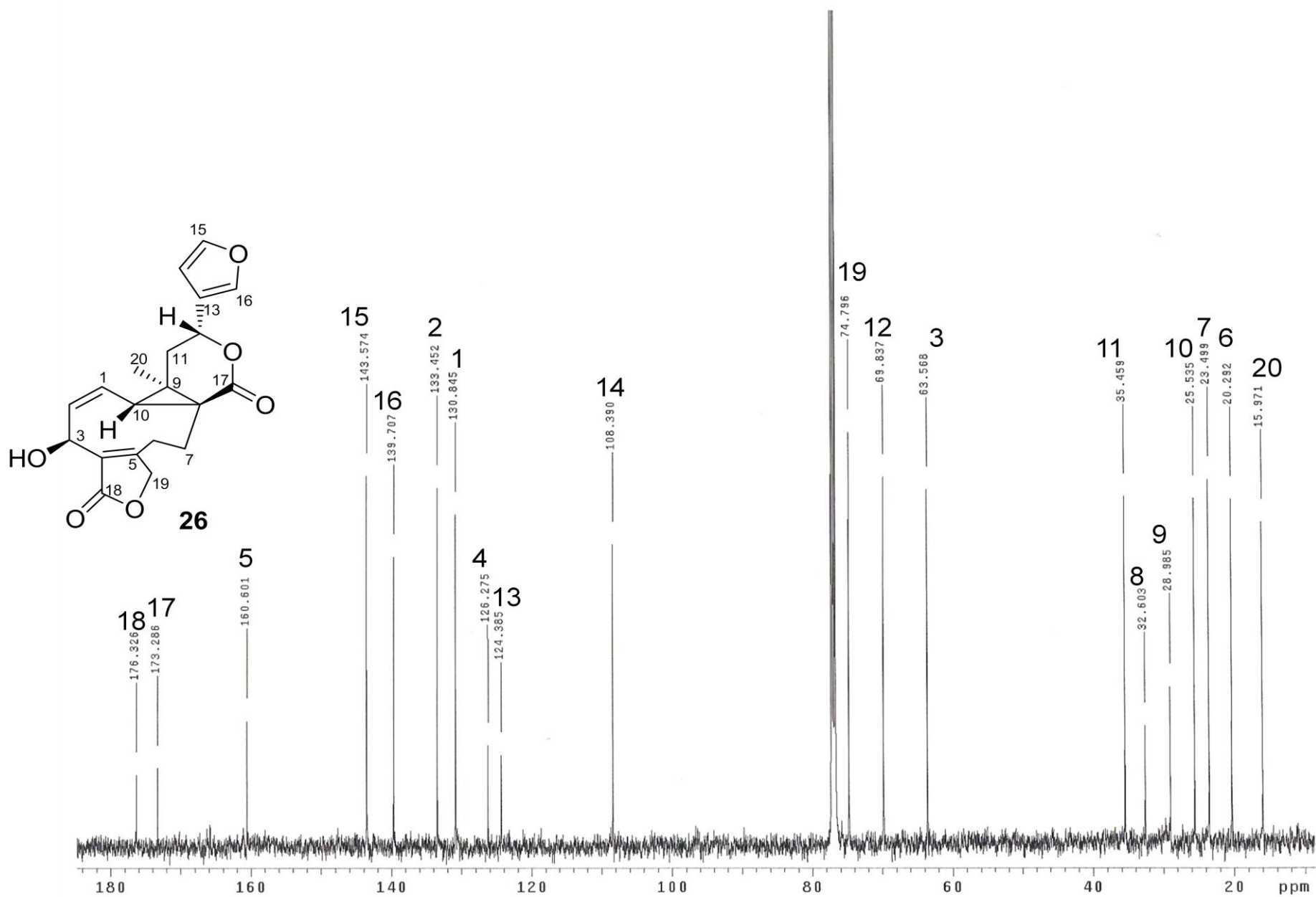
Espectro C-7: RMN de ¹H de la **linearolactona** determinado en CDCl₃ a 500 MHz.



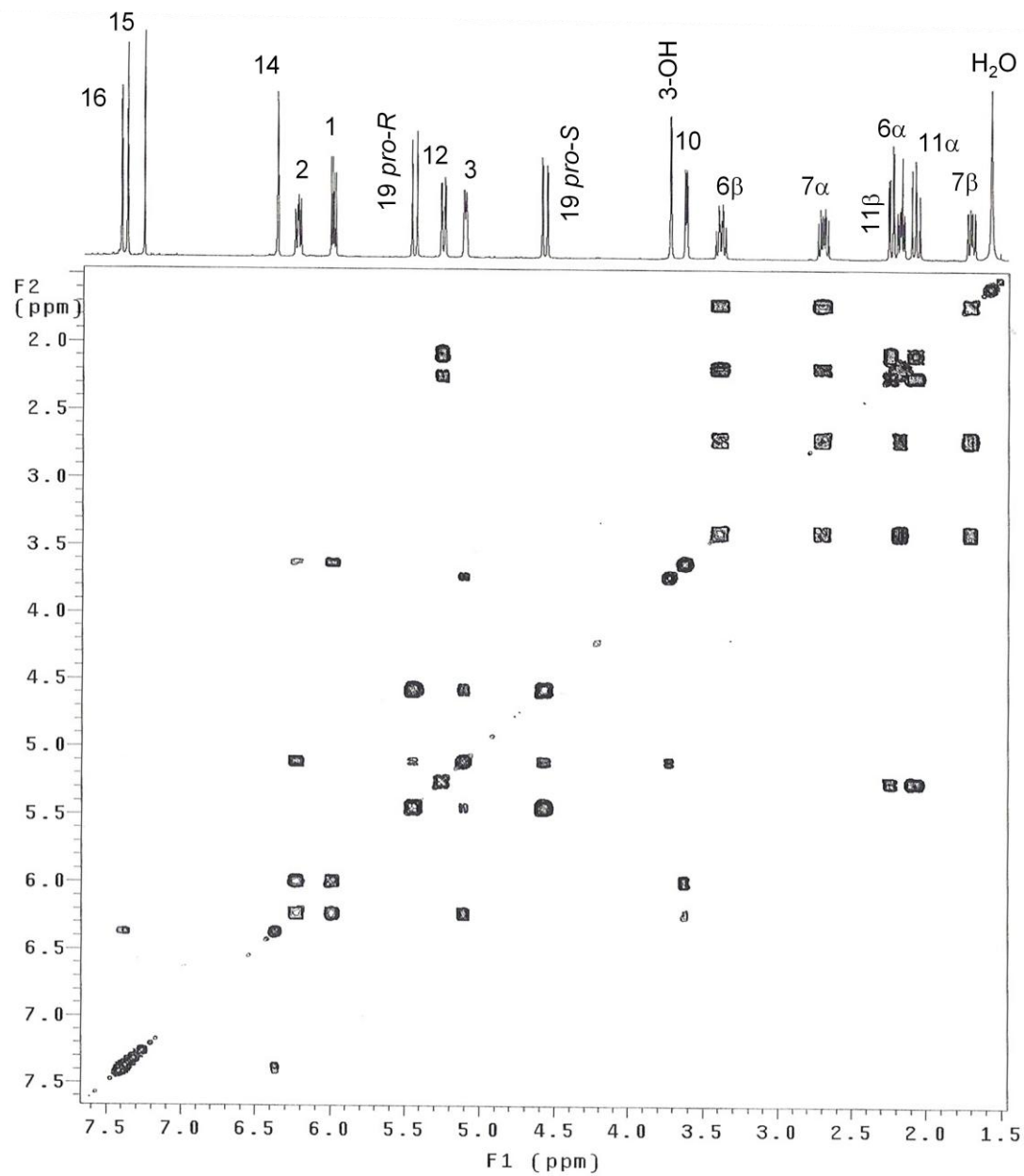
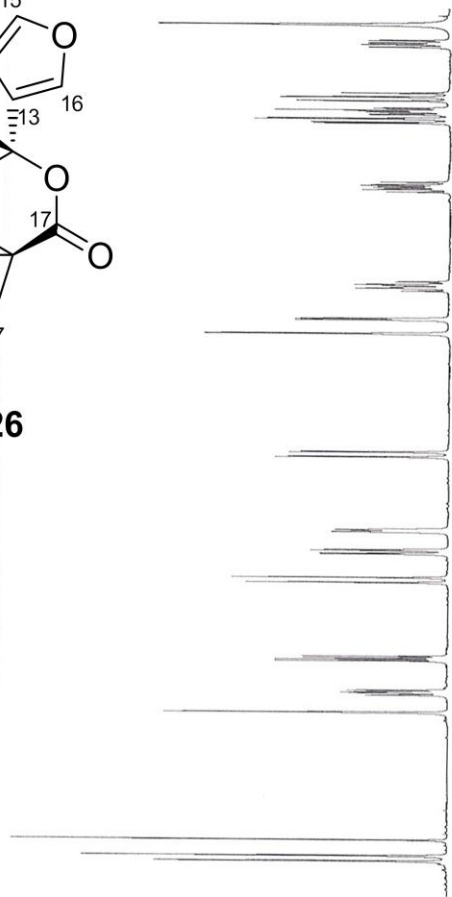
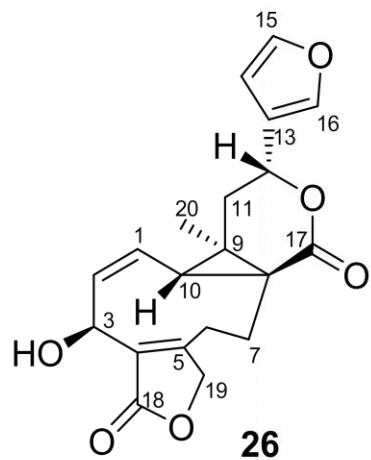
Espectro C-8: RMN de ¹³C del linearolactona determinado en CDCl₃ a 125 MHz.



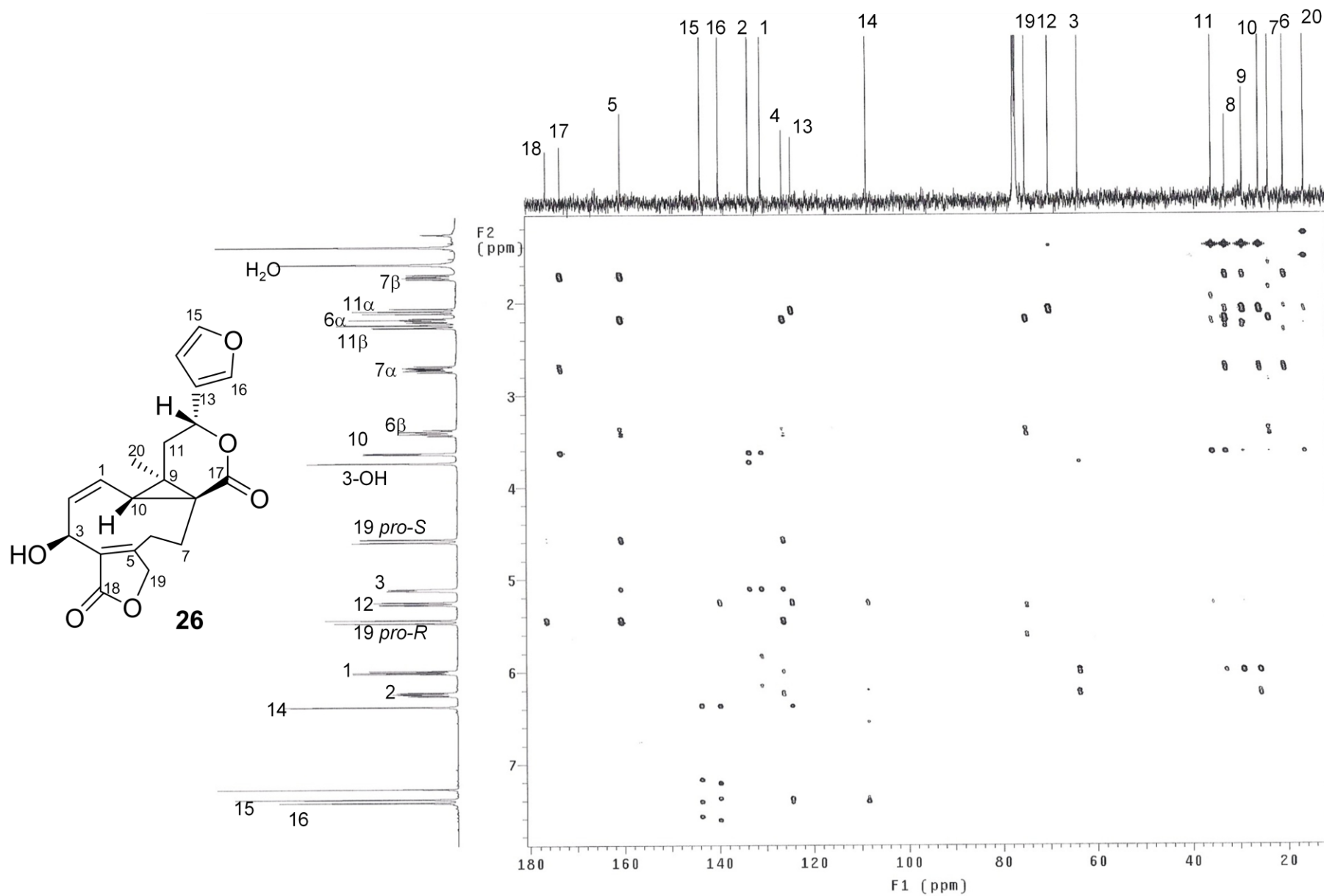
Espectro C-9: RMN de ¹H del compuesto **26** determinado en CDCl₃ a 500 MHz.



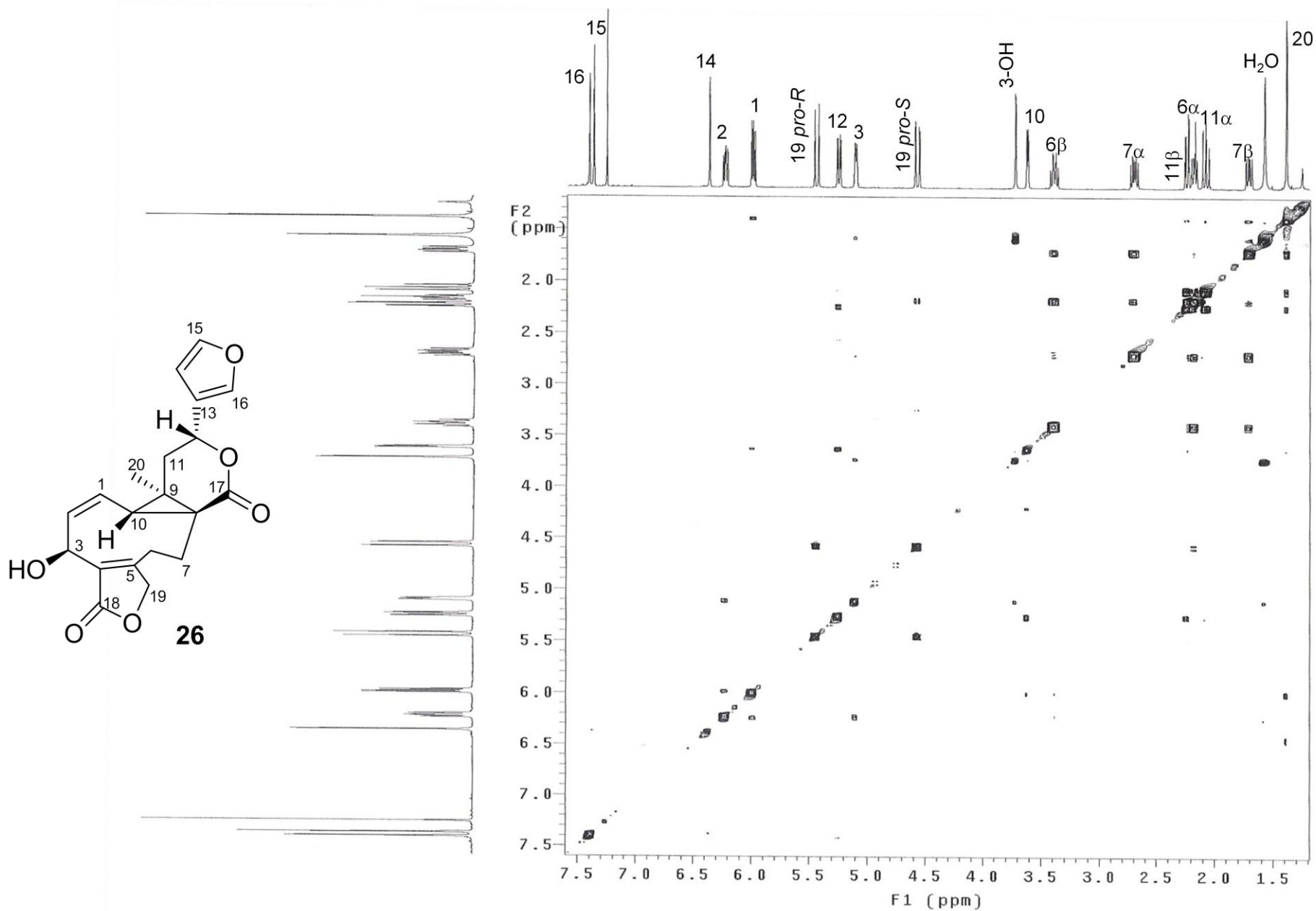
Espectro C-10: RMN de ^{13}C del compuesto **26** determinado en CDCl_3 a 125 MHz.



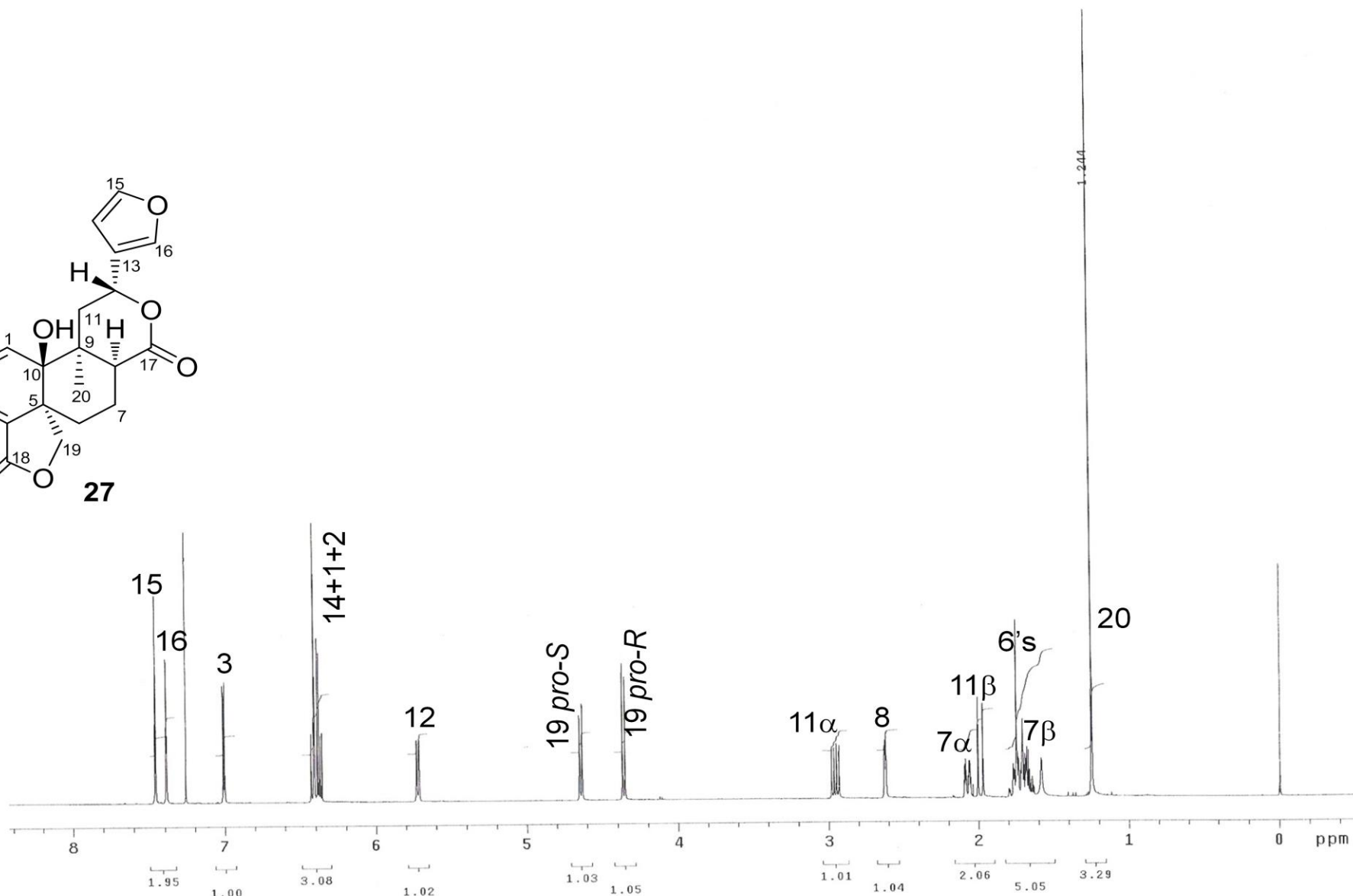
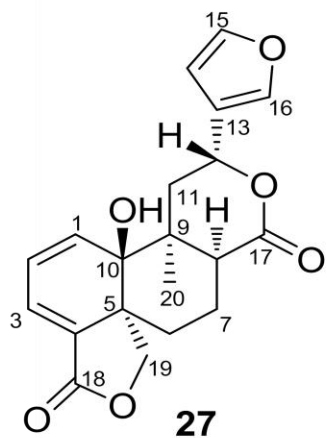
Espectro C-11: Experimento COSY del compuesto **26** determinado en CDCl_3 .



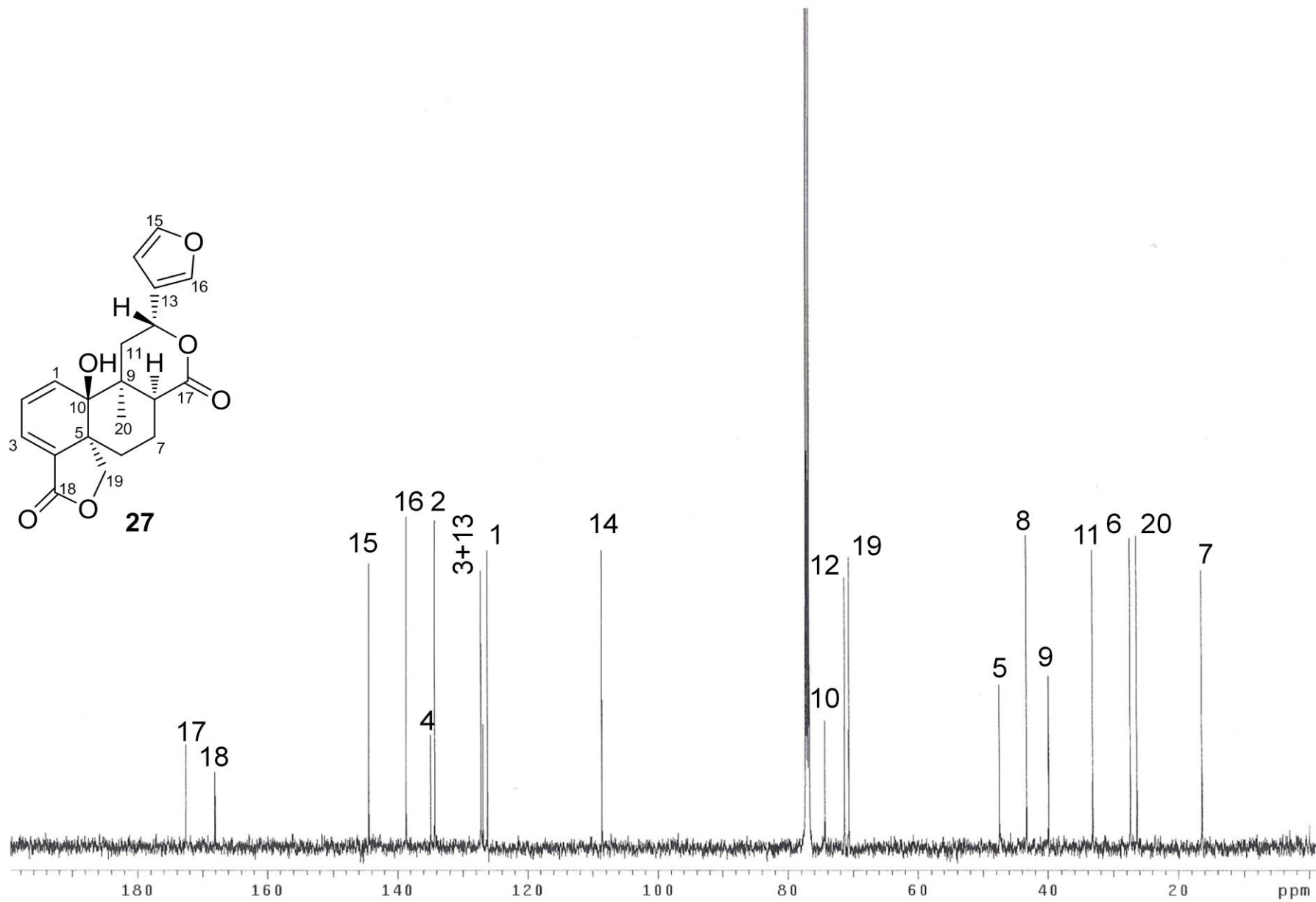
Espectro C-12: Experimento HMBC del compuesto **26** determinado en CDCl₃.



Espectro C-13: Experimento NOESY del compuesto **26** determinado en CDCl₃.



Espectro C-14: RMN de ^1H del compuesto **27** determinado en CDCl_3 a 500 MHz.



Espectro C-15: RMN de ^{13}C del compuesto **27** determinado en CDCl_3 a 125 MHz.

Apéndice D

Artículos derivados del proyecto de investigación

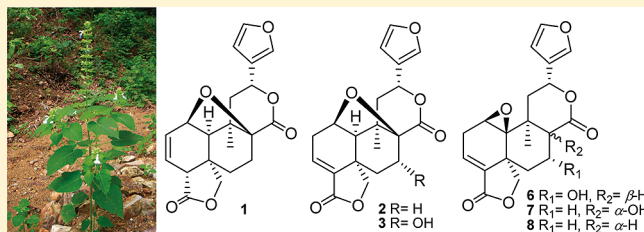
neo-Clerodane Diterpenes from *Salvia herbacea*

Elihú Bautista, Emma Maldonado, and Alfredo Ortega*

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, D. F., México

S Supporting Information

ABSTRACT: Chemical investigation of the aerial parts of *Salvia herbacea* led to the isolation of eight new neo-clerodane diterpenes (1–8), named tehanins A–H, and three known compounds. The structures of these compounds were determined by analysis of their spectroscopic data. Three of the new diterpenes possess a 1,8-epoxy group (1–3). This unusual structural feature was confirmed by X-ray diffraction of 1. The structure of the previously isolated 1 α ,10 α -epoxysalviarin was revised. The absolute configuration of 6 was established by X-ray diffraction analysis of its bromo derivative 6a. Cytotoxic and anti-inflammatory activities of these diterpenes were examined. None of the compounds were considered to be cytotoxic; however, compound 7 exhibited anti-inflammatory activity comparable to that of indomethacin.

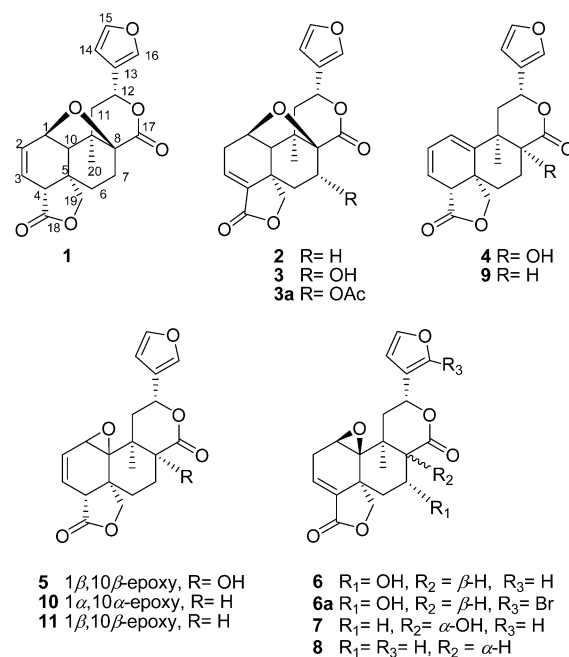


Salvia is one of 224 genera in the family Lamiaceae. This subcosmopolitan genus comprises about 900 species, including some that are used for ornamental, culinary, or medicinal purposes.¹ *Salvia* species have been utilized in traditional Mexican medicine to treat dysentery, diarrhea, and insomnia and for their abortive, expectorant, and antipyretic properties.² Metabolites reported from this genus include triterpenes,³ flavonoids,⁴ sesterterpenes,⁵ and diterpenes. Diterpenes from *Salvia* are mainly abietanes and neo-clerodanes, many of them with modified skeletons.⁶ Some of these diterpenes have shown cytotoxic,⁷ antiprotozoal,⁸ and phytotoxic activities,⁹ and one of them, salvinin A, is a nonalkaloidal, naturally occurring hallucinogen and also the first non-nitrogenous κ -opioid selective agonist.¹⁰ Salvinin A was isolated from *Salvia divinorum*,¹¹ a hallucinogenic plant used by Mazatec healers in magical rites of divination. As a part of our ongoing study of diterpenes from *Salvia*, we have now investigated the aerial parts of *Salvia herbacea* Benth. (Lamiaceae, subgenus *Calosphace*), a herbaceous plant that grows on the Isthmus of Tehuantepec in Southern Mexico. Herein, we report the structural elucidation of the isolates from this plant and the results of tests of their cytotoxic and anti-inflammatory activities.

RESULTS AND DISCUSSION

Fractionation of a Me₂CO extract of aerial parts of *S. herbacea* led to the isolation of eight new diterpenes, tehanins A–H (1–8), together with the known 1(10)-dehydrosalviarin (9),¹² 1 α ,10 α -epoxysalviarin (10), previously isolated from *Salvia lineata*,¹³ and 5,6,3'-trihydroxy-7,4'-dimethoxyflavone.¹⁴ The published structure of compound 10 will be discussed.

Tehanin A (1) was isolated as colorless crystals. It has the molecular formula C₂₀H₂₀O₆, as deduced from the [M + H]⁺ ion at *m/z* 357.1330 in the HRFABMS. Its ¹³C NMR spectrum



showed 20 signals, and the IR spectrum indicated the presence of γ - and δ -lactones and a furan ring. This information together with previous studies of the chemistry of genus *Salvia* subgenus *Calosphace*^{6a} suggested that 1 had a neo-clerodane skeleton. The ¹H and ¹³C NMR spectra of 1 (Table 1) showed the presence of a tertiary methyl group (δ_{H} 1.30 s, δ_{C} 23.6, CH₃-20), a furan ring (δ_{H} 6.45, H-14; δ_{H} 7.44, H-15; δ_{H} 7.51, H-16), a 18,19- γ -lactone (δ_{C} 172.8, C-18; δ_{C} 76.3, δ_{H} 4.68, 4.10, CH₂-19), and a

Received: February 23, 2012

Published: May 11, 2012

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR Data for Compounds 1–3 and 3a^a

position	1 ^b		2		3 ^d		3a ^e	
	δ_{H} mult. (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult. (J in Hz)	δ_{C}
1	4.49 t (5.0)	71.6 CH	4.55 ddd (8.0, 4.0, 1.0)	75.3 CH	4.54 ddd (8.0, 4.0, 1.0)	75.3 CH	4.58 m ^c	75.3 CH
2a	6.26 ddd (10.0, 5.0, 2.0)	126.6 CH	3.08 ddd (21.0, 8.0, 6.0)	31.0 CH ₂	3.06 ddd (20.5, 8.0, 6.5)	30.8 CH ₂	3.08 ddd (21.0, 8.0, 6.5)	30.7 CH ₂
2b			2.78 ddd (21.0, 2.5, 1.0)		2.70 ddd (20.5, 2.5, 1.0)		2.75 br dd (21.0, 2.5)	
3	6.10 dd (10.0, 6.0)	122.9 CH	6.88 dd (6.0, 2.5)	134.0 CH	6.88 dd (6.5, 2.5)	133.4 CH	6.90 dd (6.5, 2.5)	133.8 CH
4 β	3.00 dd (6.0, 2.0)	49.2, CH		137.1 C		137.5 C		136.9 C
5		40.3 C		41.1, C		40.2 C		40.2 C
6 α	1.87 m ^c	25.3 CH ₂	2.02 m ^c	31.6 CH ₂	2.20 br d (16.0) ^c	39.5 CH ₂	2.13 m ^c	38.9 CH ₂
6 β	2.03 m ^c		1.67 dddd (14.5, 12.0, 8.0, 1.0)		2.03 dd (16.0, 4.0) ^c		2.13 m ^c	
7 α	1.90 m ^c	25.4 CH ₂	1.91 m ^c	25.8 CH ₂		69.1 CH		68.1 CH
7 β	2.15 dd (13.0, 8.5)		2.21 dd (14.5, 8.0)		4.42 dd (8.0, 2.0)		5.49 t (4.5)	
8		82.4 C		82.2 C		81.3 C		80.4 C
9		44.8 C		44.9 C		45.0 C		45.0 C
10 α	2.06 d (5.0) ^c	46.6 CH	1.91 d (4.0) ^c	57.5 CH	1.96 d (4.0)	57.6 CH	1.99 d (4.0)	57.5 CH
11 α	2.06 m ^c	43.2 CH ₂	2.02 m ^c	43.7 CH ₂	2.10 m ^c	44.7 CH ₂	2.13 m ^c	44.4 CH ₂
11 β	2.06 m ^c		2.02 m ^c		2.04 m ^c		2.06 m ^c	
12 β	5.81 dd (11.5, 5.0)	71.7 CH	5.78 dd (12.0, 4.5)	72.0 CH	5.75 dd (12.0, 4.0)	72.3 CH	5.68 dd (12.0, 4.0)	71.6 CH
13		123.7 C		124.3 C		123.9 C		124.1 C
14	6.45 dd (2.0, 1.0)	107.8 CH	6.44 dd (2.0, 1.0)	108.4 CH	6.45 dd (2.0, 0.5)	108.3 CH	6.44 dd (2.0, 1.0)	108.3 CH
15	7.44 dd (2.0, 1.5)	143.1 CH	7.43 t (2.0)	143.8 CH	7.44 t (1.5)	143.9 CH	7.44 t (2)	143.9 CH
16	7.51 m	139.2 CH	7.49 m	139.8 CH	7.50 m	140.0 CH	7.49 m	139.9 CH
17		168.9 C		169.7 C		171.0 C		169.1 C
18		172.8 C		168.2 C		168.2 C		167.1 C
19 _{pro-R}	4.10 d (9.5)	76.3 CH ₂	4.50 d (9.5)	79.3 CH ₂	4.69 d (9.5)	80.4 CH ₂	4.57 d (9.0)	79.8 CH ₂
19 _{pro-S}	4.68 d (9.5)		4.24, dd (9.5, 1.0)		4.29 dd (9.5, 0.5)		4.30 d (9.0)	
20	1.30 s	23.6 CH ₃	1.21 s	22.9 CH ₃	1.49 s	23.3 CH ₃	1.49 s	23.5 CH ₃

^aSpectra taken in CDCl₃ at 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C . ^bCDCl₃–DMSO-*d*₆. ^cOverlapped signal. ^dOH signal at δ_{H} 2.95 (br s). ^eMeCO signals at δ_{H} 2.05 (s), δ_{C} 21.0 (CH₃), 168.0 (C).

17,12- δ -lactone (δ_{C} 168.9, C-17; δ_{C} 71.7, δ_{H} 5.81, CH-12). In the HMBC spectrum, the signal at δ_{H} 3.00 (dd, $J = 6.0, 2.0$ Hz) correlated with the γ -lactone carbonyl (C-18), and it was assigned to H-4. In the COSY spectrum the last proton signal showed cross-peaks with the signals at δ_{H} 6.26 (ddd, $J = 10.0, 5.0, 2.0$ Hz, H-2) and 6.10 (dd, $J = 10.0, 6.0$ Hz, H-3), indicating the presence of a double bond at C-2. The COSY spectrum also showed cross-peaks between H-2 and the signal at δ_{H} 4.49 (br t, $J = 5.0$ Hz, H-1) and between H-1 and the signal at δ_{H} 2.06 (d, $J = 5.0$ Hz, H-10). These assignments were confirmed by the HMBC correlations shown in Figure 1. The chemical shifts of H-1 and C-1 (δ_{C} 71.6) indicated an

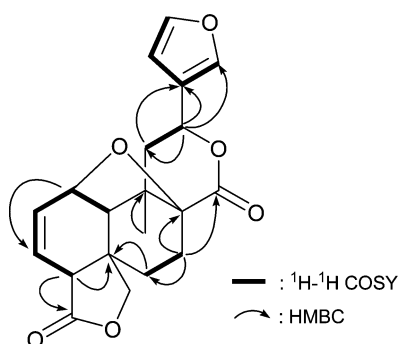


Figure 1. Key ^1H – ^1H COSY and HMBC correlations of 1.

oxygenated function at this position. In addition, the ^{13}C NMR spectrum showed a signal for an oxygenated non-protonated carbon at δ_{C} 82.4. HMBC correlations from H₂-6, H₂-7, H₃-20, and H-10 and/or H₂-11 (superimposed signals at δ_{H} 2.06) to the last mentioned carbon signal allowed its assignment to C-8. Thus, both C-1 and C-8 were bonded to oxygenated functions. However, five of the six oxygen atoms contained in the molecular formula of 1 were part of the lactones and the furan ring; therefore the sixth one must be present as an 1,8-epoxy group. This proposal was consistent with the molecular formula of 1 (degree of unsaturation of 11). Regarding the relative configuration of 1, the H-12 coupling constants ($J_{11\alpha-12} = 11.5$ Hz, $J_{11\beta-12} = 5.0$ Hz) established its axial disposition, its NOE correlations with H-1, its β -orientation, and also the β -orientation of the 1,8-epoxy group. NOESY correlations from H₃-20 to H-7 α and H-19_{pro-S} and those of H-19_{pro-R} with H-4 and H-6 α indicated the β -orientation of H-4 and, therefore, a *cis*-fused γ -lactone. Thus, structure 1 was established for tehuainin A. This structure was confirmed by X-ray diffraction analysis of 1 (Figure 2).

Tehuainin B (2) was an isomer of compound 1 (C₂₀H₂₀O₆, by HRFABMS). Comparison of the NMR spectra of these compounds indicated that they differed only in the position of the double bond in ring A, which in 2 was conjugated with the γ -lactone. This was deduced from the chemical shift of the γ -lactone carbonyl of 2 (δ_{C} 168.2, C-18), as well as from the

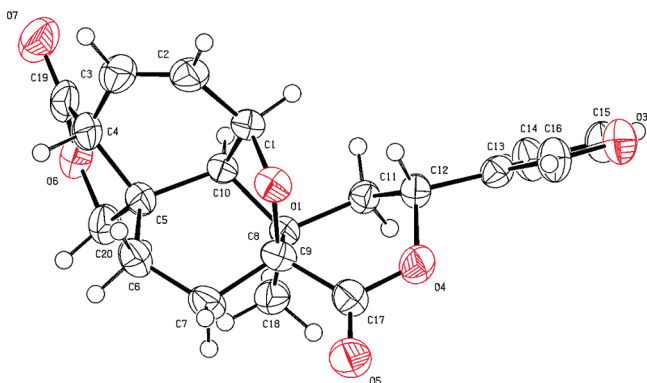


Figure 2. ORTEP diagram (crystallographic numbering) of tehuanine A (**1**).

signals of a trisubstituted double bond (δ_{H} 6.88, dd, $J = 6.0, 2.5$ Hz, δ_{C} 134.0, CH-3; δ_{C} 137.1, C-4). In the COSY spectrum, H-3 showed cross-peaks with the protons of a methylene at δ_{H} 3.08 (ddd, $J = 21.0, 8.0, 6.0$ Hz) and 2.78 (ddd, $J = 21.0, 2.5, 1.0$ Hz), which were assigned to H-2a and H-2b, respectively. In turn H-2a correlated with a proton geminal to the 1,8-epoxy group (δ_{H} 4.55 ddd, $J = 8.0, 4.0, 1.0$ Hz, H-1). The above-mentioned was confirmed by HMBC correlations from H-1 to C-3 and C-5 (δ_{C} 41.1) and those from H-3 to C-1 (δ_{C} 75.3), C-2 (δ_{C} 31.0), C-5, and C-18. NOESY correlations from H-1 to H-2a (α -oriented), H-2b (weak), H-10, and H-12, from H-19_{pro-R} to H-6 α and H₃-20, and from H-19_{pro-S} to H-10 and H₃-20 established that tehuanine B (**2**) had the same relative configuration as compound **1**.

Tehuanine C (**3**) showed a $[M + H]^+$ ion at m/z 373.1281, which was consistent with the molecular formula $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$, indicating that **3** contained one oxygen more than **2**. The IR spectrum of **3** showed, in addition to the absorptions for γ - and

δ -lactones and a furan ring, a band indicative of an OH group at 3497 cm^{-1} . The NMR spectra of **2** and **3** were similar. The main differences were signals for an oxygenated methine in the spectra of **3** (δ_{H} 4.42, δ_{C} 69.1) instead of those of a methylene in **2**. The methine signals were attributed to CH-7 on the basis of the HMBC correlations from H-7 to C-5, C-8, and C-9 and from H₂-6 to C-7. The COSY spectrum showed a cross-peak between H-7 and a broad OH singlet at δ_{H} 2.95, thus placing the OH at C-7. The H-7 coupling constants (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz) indicated its equatorial disposition and, therefore, α -axial orientation of the OH. The latter was supported by preparation of the acetyl derivative **3a**. Compound **3a** exhibited a $[M + H]^+$ ion at m/z 415.1394, in agreement with the molecular formula $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_8$. The ^1H and ^{13}C NMR spectra of **3a** showed the presence of an acetyl group and a low-field shift of H-7. Thus, the structure of tehuanin C was established as **3**.

Tehuanine D (**4**) had the molecular formula $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$; $[M + H]^+$ at m/z 357.1335 in the HRFABMS. The ^{13}C NMR spectrum showed 20 signals, and the IR spectrum indicated the presence of an OH, γ - and δ -lactones, and a furan ring, suggesting that **4** also possessed a clerodane-type skeleton. Its ^1H and ^{13}C NMR spectra (Tables 2 and 3) showed the presence of a tertiary methyl group (δ_{H} 1.21 s, CH₃-20) and a furan ring (δ_{H} 6.47, H-14; δ_{H} 7.43, H-15; δ_{H} 7.50, H-16). The 1(10),2-diene system was deduced from the three olefinic proton signals (δ_{H} 6.11, 6.19, and 5.63), which were assigned to H-1, H-2, and H-3, respectively, on the basis of HMBC correlations. Compound **4** also possesses a 18,19- γ -lactone (δ_{C} 177.0, C-18; δ_{C} 75.8, δ_{H} 4.48 and 4.01, CH₂-19) and a 17,12- δ -lactone (δ_{C} 172.5, C-17; δ_{C} 71.2, δ_{H} 5.54, CH-12). All these structural features were the same as those of 1(10)-dehydrosalvarin (**9**),¹³ but whereas in **9** C-8 was a methine (δ_{C} 48.5, δ_{H} 2.55, CH-8), in **4** C-8 was bonded to an OH group (IR 3432 cm^{-1}). This was evident from the chemical shift of the

Table 2. ^1H NMR Data of Compounds 4–8 and 11 (500 MHz, CDCl_3)

position	4	5 ^a	6 ^c	7	8 ^d	11 ^a
1	6.11 d (6.0)	3.63 dd (4.5, 1.5)	3.55 br s	3.46 br s	3.62 br s	3.59 dd (4.5, 2.0)
2a	6.19 ddd (9.5, 6.0, 3.0)	6.29 ddd (9.5, 4.5, 3.0)	2.95 ddd (21.0, 3.0, 1.5)	2.96 ddd (21.0, 3.0, 1.0)	2.96 ddd (21.2, 3.2, 1.2)	6.28 ddd (9.5, 4.5, 3.0)
2b			2.75 ddd (21.0, 4.0, 2.5)	2.76 ddd (21.0, 4.0, 2.5)	2.76 ddd (21.2, 4.0, 2.4)	
3	5.63 ddd (9.5, 3.0, 0.5)	5.66 dt (9.5, 1.5) ^b	6.41 m ^b	6.38 ddd (4.0, 3.0, 1.0)	6.43 m	5.66 dt (9.5, 2.0) ^b
4 β	3.08 t (3.0)	2.85 br t (3.0)				2.87 br t (3.0)
6 α	1.94 dt (14.5, 3.5)	2.03 dt (14.0, 4.5)	2.41 dd (14.0, 2.0)	2.34 dt (13.5, 8.5)	2.03 m ^b	1.86 m
6 β	1.35 dddd (14.5, 14.5, 3.5, 2.0)	1.75 m ^b	1.98 ddd (14.0, 3.5, 2.0)	1.97 m ^b	1.94 m ^b	1.79 m ^b
7 α	2.03 td (13.5, 3.5)	1.95 ddd (13.5, 12.0, 4.5)		1.94 m ^b	2.03 m ^b	2.03 m
7 β	2.47 dt (13.5, 3.5)	2.65 dt (13.5, 4.5)	4.67 br dt (3.5, 2.0)	2.52 dt (14.0, 9.0)	2.60 m ^b	2.62 m ^b
8			3.07 d (3.5)		2.63 m ^b	2.60 m ^b
11 α	2.65 dd (15.5, 12.5)	2.26 dd (15.0, 12.0)	1.47 dd (13.5, 10.5)	1.60 dd (15.0, 11.5)	1.68 dd (14.8, 11.2)	1.74 dd (15.0, 10.0)
11 β	2.24 dd (15.5, 3.5)	1.77 dd (15.0, 4.5) ^b	2.14 dd (13.5, 7.0)	1.90 dd (15.0, 2.0)	2.11 dd (14.8, 3.6)	2.16 dd (15.0, 5.0) ^b
12 β	5.54 dd ((12.5, 3.5)	5.63 dd (12.0, 4.5) ^b	5.26 dd (10.5, 7.0)	5.74 dd (11.5, 2.0)	5.57 dd (11.2, 3.6)	5.76 dd (10.0, 5.0) ^b
14	6.47 ddd (2.0, 1.0, 0.5)	6.48 dd (2.0, 1.0)	6.42 dd (2.0, 1.0) ^b	6.41 dd (2.0, 1.0)	6.40 dd (1.6, 0.8)	6.39 br s
15	7.43 td (1.5, 0.5)	7.40 t (2.0)	7.45 t (2.0)	7.43 t (2.0)	7.42 t (1.6)	7.42 m
16	7.50 m	7.46 m	7.47 m	7.49 m	7.44 m	7.43 m
19 pro-R	4.48 d (8.5)	4.50 d (8.5)	5.65 d (7.0)	5.32 d (7.5)	4.58 d (8.0)	4.47 d (9.0)
19 pro-S	4.01 dd (8.5, 2.0)	4.16 dd (8.5, 2.0)	3.93 dd (7.0, 2.0)	4.02 dd (7.5, 2.0)	4.06 dd (8.0, 1.6)	4.15 dd (9.0, 1.5)
20	1.21 s	1.11 s	1.40 s	1.07 s	1.20 s	1.22 s

^aIn CDCl_3 -DMSO- d_6 . ^bOverlapped. ^c7-OH signal at δ_{H} 4.15 (br s). ^dDetermined at 400 MHz.

Table 3. ^{13}C NMR Data (δ) of Compounds 4–8 and 11 (125 MHz, CDCl_3)

position	4	5 ^a	6	7	8 ^b	11 ^a
1	120.7 CH	48.9 CH	57.3 CH	53.4 CH	55.4 CH	49.0 CH
2	124.6 CH	125.6 CH	27.2 CH ₂	27.3 CH ₂	27.2 CH ₂	125.69 CH
3	119.1 CH	125.3 CH	127.7 CH	126.2 CH	128.1 CH	125.72 CH
4	51.5 CH	51.0 CH	133.8 C	134.0 C	132.7 C	50.7 CH
5	42.1 C	42.9 C	42.7 C	41.1 C	43.2 C	43.3 C
6	32.0 CH ₂	30.0 CH ₂	33.9 CH ₂	26.3 CH ₂	27.2 CH ₂	29.3 CH ₂
7	28.0 CH ₂	27.2 CH ₂	66.0 CH	30.9 CH ₂	20.2 CH ₂	18.0 CH ₂
8	75.0 C	73.2 C	48.1 CH	74.6 C	46.9 CH	45.4 CH
9	42.1 C	41.4 C	39.5 C	41.8 C	38.2 C	36.9 C
10	139.4 C	67.6 C	63.7 C	63.9 C	64.9 C	66.7 C
11	34.4 CH ₂	34.7 CH ₂	37.5 CH ₂	40.2 CH ₂	39.3 CH ₂	38.1 CH ₂
12	71.2 CH	71.6 CH	71.2 CH	72.9 CH	71.9 CH	71.4 CH
13	124.6 C	125.8 C	123.8 C	123.9 C	125.1 C	125.1 C
14	108.5 CH	108.1 CH	108.4 CH	108.1 CH	108.2 CH	107.6 CH
15	143.8 CH	143.0 CH	144.1 CH	143.9 CH	143.8 CH	143.1 CH
16	139.9 CH	139.3 CH	139.8 CH	140.0 CH	139.5 CH	138.7 CH
17	172.5 C	171.8 C	174.2 C	176.4 C	172.2 C	170.7 C
18	177.0 C	174.6 C	168.7 C	168.8 C	168.1 C	174.3 C
19	75.8 CH ₂	71.2 CH ₂	73.1 CH ₂	75.1 CH ₂	72.5 CH ₂	70.2 CH ₂
20	26.1 CH ₃	20.0 CH ₃	23.4 CH ₃	22.7 CH ₃	26.0 CH ₃	25.3 CH ₃

^aIn CDCl_3 -DMSO-*d*₆. ^bDetermined at 100 MHz.

C-8 signal (δ_{C} 75.0) and confirmed by the HMBC correlations from H-6 β , H-7 α , H-7 β , H-11 α , H-11 β , and H₃-20 to C-8. The low-field shift of the signals for carbons in a β -position to the OH, C-7 (δ_{C} 28.0) and C-9 (δ_{C} 42.1), compared with those of compound **9** (δ_{C} 19.1, C-7; δ_{C} 37.7, C-9), supported this assumption. NOESY correlations from H-7 α to H₃-20 and H-19_{pro-R} indicated α -axial dispositions of C-19 and C-20. A NOESY correlation between H-4 and H₂-6 was observed. Molecular models showed that this correlation is possible only if H-4 is β -oriented and, therefore, in a *syn*-relationship to C-6. Consequently the γ -lactone was *cis*-fused and α -oriented. The axial disposition of H-12 was deduced from its coupling constants ($J_{11\alpha-12} = 12.5$ Hz, $J_{11\beta-12} = 3.5$ Hz), and its β -orientation from its NOE correlations to H-1 and H-11 β . The upfield shift of the signals of C-11 (δ_{C} 34.4) and C-20 (δ_{C} 26.1) of **4**, with respect to the corresponding signals of **9** (δ_{C} 40.7, C-11; δ_{C} 32.1, C-20),^{12,13} can be explained only by a γ -gauche effect of the 8-OH group, which requires α -orientation of this group. Thus, structure **4** was established for tehuainin D.

Tehuainin E (**5**) showed IR absorptions for OH (3428 cm^{-1}), γ -lactone (1757 cm^{-1}), δ -lactone (1718 cm^{-1}), and a furan ring (3150, 1504, and 875 cm^{-1}). Its molecular formula was determined by HRFABMS as $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$ at m/z 373.1282). NMR data of this compound (Tables 2 and 3) were very similar to those described for a compound isolated from *S. lineata*, to which the structure 1 α ,10 α -epoxysalviarin (**10**) was assigned.¹³ This compound was also isolated in this work. The only difference between **5** and **10** was the presence of an α -oriented OH group at C-8 in **5**. This was evident from the chemical shift of C-8 (δ_{C} 73.2), as well as by the effects that this group causes on the chemical shifts of the β - (C-7, C-9) and γ -carbons (C-11, C-20) (Table 3). The NOESY correlation from H-4 to H-6 β and that from H-6 α to H-19_{pro-S}, together with those from H₃-20 to H-7 α , H-11 α , and H₂-19, indicated an α -oriented *cis*-fused γ -lactone. The β -orientation of H-12 was deduced from its NOESY correlations with H-1, H-7 β , and H-11 β . NOESY correlations from H-1 to H-2, H-11 α , H-11 β , H-12, and H₃-20 were not sufficient to determine the orientation

of the 1,10-epoxy group, since inspection of molecular models revealed that H-1 can exhibit the same NOESY interactions independent of the orientation of this group. Thus, β -orientation of the epoxy group was confirmed by an X-ray diffraction analysis of **5** (Figure 3). This analysis also confirmed the proposed structure **5** for tehuainin E.

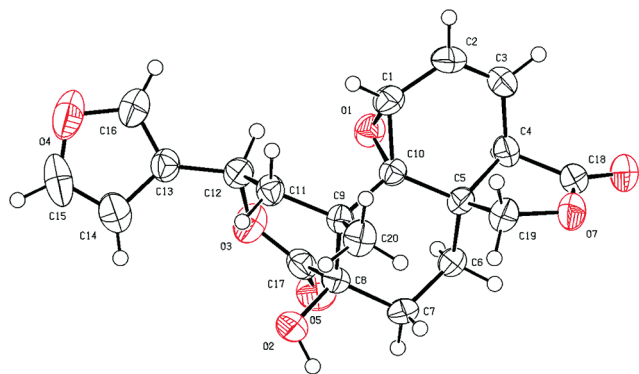


Figure 3. ORTEP diagram of tehuainin E (**5**).

The above results and the close similarity of the ^1H and ^{13}C NMR data of **5** and **10**, especially those concerning ring A, indicated that they have the same configuration. Therefore the structure of compound **10** must be revised to 1 β ,10 β -epoxysalviarin (**11**).

The IR spectrum of tehuainin F (**6**) showed absorptions for OH, γ - and δ -lactones, a double bond, and a furan ring. The ^{13}C NMR spectrum showed 20 signals, which, in accordance with DEPT and HSQC experiments, corresponded to one methyl, four methylene, eight methine, and seven nonprotonated carbons. The HRFABMS spectrum showed a $[\text{M} + \text{H}]^+$ ion at 373.1288, consistent with the molecular formula $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$, indicating that **6** was an isomer of **5**. The ^1H and ^{13}C NMR signals confirmed the presence of a furan ring (δ_{H} 6.42, H-14; 7.45, H-15; 7.47, H-16), a 18,19- γ -lactone (δ_{C} 168.7, C-18; δ_{H}

5.65 d, $J = 7.0$ Hz; δ_{H} 3.93 dd, $J = 7.0, 2.0$ Hz, δ_{C} 73.1, CH₂-19), and a 17,12- δ -lactone (δ_{C} 71.2, δ_{H} 5.26 dd, $J = 10.5, 7.0$ Hz, H-12; δ_{C} 174.2, C-17). The signal at δ_{H} 3.07 (d, $J = 3.5$ Hz) was assigned to H-8 since, in the HMBC spectrum, it correlated with C-17, and in the COSY experiment with H-7. The chemical shift of the H-7 signal (δ_{H} 4.67) revealed an OH at C-7. The 1,10-epoxy group was deduced from the signals for C-10 (δ_{C} 63.7) and CH-1 (δ_{C} 57.3, δ_{H} 3.55). COSY cross-peaks of H-1 with H-2 β and those of H-2 α and H-2 β with the olefinic proton at δ_{H} 6.41 showed that a double bond was located at C-3 in **6** and that the γ -lactone was α,β -unsaturated. This was confirmed by the chemical shift of the lactone carbonyl (δ_{C} 168.7). The α -axial disposition of CH₃-20 and CH₂-19 was deduced from the NOESY correlations of H-11 α to H₃-20 and those of H₃-20 to H₂-19. NOESY correlations from H-12 to H-8 and H-11 β and those from H-8 to H-6 β , H-7, H-11 β , and H-12 established a β -orientation of H-8 and α -orientations of both the furan ring and the 7-OH group. The orientation of the epoxy group could not be deduced from the NOESY correlations from H-1 to H₂-2 and H-11 β ; only the weak interaction from H-1 to the α -oriented CH₃-20 seems to account for a β -epoxy group. In order to confirm this point and also to establish the absolute configuration of **6**, a single-crystal X-ray diffraction analysis of its 16-bromo derivative **6a** (NMR data in Experimental Section) was carried out. The results (Figure 4) confirmed the above-mentioned, including β -orientation of the epoxy group, and also established that tehuanine F (**6**) has the configuration of a *neo*-clerodane diterpene.

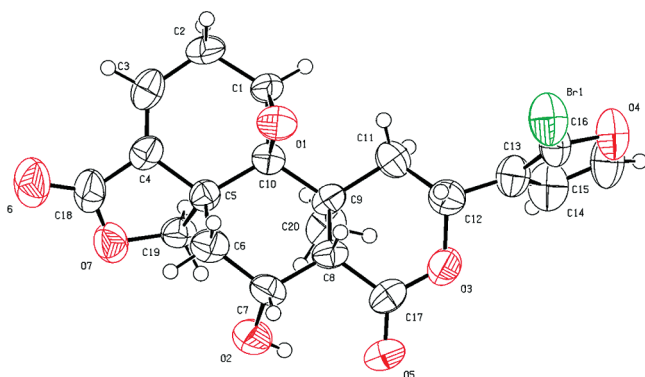


Figure 4. ORTEP diagram of 16-bromotehuanine F (**6a**).

Tehuanine G (**7**) had the same molecular formula as **6**, and the same functional groups in the IR spectrum. The NMR spectra of both compounds were quite similar, except that **7** had a tertiary OH group at C-8, instead of the secondary 7-OH group of **6**. This was established by the chemical shift of C-8 (δ_{C} 74.6) and the HMBC correlations from H₂-6, H-7 α , H-11 β , and H₃-20 to this carbon. The NOESY correlations from H-12 to H-7 β and H-11 β indicated the α -orientation of the OH group.

The HRFABMS spectrum of tehuanine H (**8**) showed a pseudomolecular ion at m/z 357.1347 (C₂₀H₂₀O₆). The IR spectrum showed absorptions typical of a furan ring, γ - and δ -lactones, and a double bond. The NMR spectra of **7** and **8** were quite similar, but compound **8** lacked the OH group of **7**. This was evident from the signals at δ_{C} 46.9 and δ_{H} 2.63, which were attributed to CH-8 on the basis of the correlations from H-6 β and H-11 β to C-8, observed in the HMBC spectrum of **8**. The

α -orientation of H-8 was deduced from its NOESY interactions with H-19_{pro-R} and H₃-20, as well as those of H-12 with H-1, H-7 β , and H11 β . The NOESY spectrum also revealed that **7** and **8** had the same relative configuration in all the other stereogenic centers common to both compounds.

Cytotoxicity of the isolated diterpenes was evaluated against six human cancer cell lines: HCT-15, MCF-7, K-562, U-251, PC-3, and SKLU-1.¹⁵ Only compound **6** showed a marginal cytotoxicity against U251 (IC₅₀ 41.86 \pm 1.4 μ M) and SKLU-1 (IC₅₀ 38.92 \pm 4.1 μ M) cell lines. The anti-inflammatory activity of compounds **4**–**9** and **11** was evaluated using the TPA-induced ear edema model.¹⁶ Compound **7** exhibited anti-inflammatory activity (IC₅₀ 0.24 μ M/ear) comparable to that of the reference compound (indomethacin). This result suggests the need of a more extensive study of the anti-inflammatory properties of compound **7**.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures. Melting points (uncorrected) were determined on a Fisher-Johns apparatus. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 343 polarimeter. UV spectra were recorded on a Shimadzu UV 160U spectrophotometer. IR spectra were obtained on a Bruker Tensor 27 spectrometer. 1D and 2D NMR experiments were performed on a Varian Unity Plus 500 or on a Bruker Avance III spectrometer. Chemical shifts were referred to TMS. EIMS were obtained on a JEOL JMS-AX505SHA mass spectrometer. FABMS and HRFABMS were determined on a JEOL JMS-SX102A mass spectrometer. Column chromatography (CC) assisted with vacuum was performed on silica gel 60 (Merck G) or on a bentonitic clay¹⁷ (Tonsil Mexicana). Silica gel 230–400 mesh (Macherey-Nagel) was used for flash chromatography. TLC was carried out on precoated Macherey-Nagel Sil G/UV254 plates of 0.25 thickness. X-ray crystallographic analyses were carried out on a Bruker Smart Apex CCD diffractometer with graphite-monochromated Mo K α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å).

Plant Material. Aerial parts of *S. herbacea* were collected at Tehuantepec, Oaxaca State, México, in August 2009. A voucher specimen (MEXU-1 039 699) was deposited at the National Herbarium.

Extraction and Isolation. The dried and powered aerial parts of *S. herbacea* (4.55 kg) were extracted with Me₂CO. The extract was concentrated at reduced pressure to obtain 308 g of residue, which was defatted by partition between hexane and MeOH–H₂O, 4:1. The hexane fraction was concentrated to obtain 125 g of residue. The MeOH–H₂O fraction was concentrated to one-fifth of its volume and extracted with EtOAc. The EtOAc fraction (172 g) was submitted to CC eluted with hexane–CH₂Cl₂, 1:1 (fractions A and B), CH₂Cl₂ (fraction C), CH₂Cl₂–Me₂CO, 95:5 (fraction D), CH₂Cl₂–Me₂CO, 9:1 (fraction E), CH₂Cl₂–Me₂CO, 7:3 (fraction F), and Me₂CO (fraction G). Fraction B (53.9 g) was separated by CC on bentonitic clay¹⁷ as follows: B1 (hexane, 0.15 g); B2 (hexane–CH₂Cl₂, 1:1; 32.58 g); B3 (EtOAc, 10.88 g). Fractions B2 and B3 were combined and purified by silica gel CC eluted with hexane–EtOAc, 4:1 (B2a, 8.4 g), 3:1 (B2b, 16.5 g), and 7:3 (B2c, 8.9 g). Fraction B2b was subjected to CC eluted with hexane–Me₂CO, 4:1 and 7:3, to obtain fractions B2b1 and B2b2, respectively. Compound **4** (6.18 g) was isolated from fraction B2b1 by crystallization from Me₂CO–hexane. Fraction B2b2 (5.1 g) was a mixture of compounds **4** and **9**. This fraction was purified by CC eluted with CHCl₃–EtOAc (98:2 to 70:30). Fractions eluted with CHCl₃–EtOAc, 98:2, gave 0.93 g of **4** and 0.48 g of **9**. Fraction B2c was subjected to flash chromatography (CHCl₃–EtOAc, 95:5) to give compounds **6** (363.6 mg), **7** (371.1 mg), and **10** (26.9 mg). CC of fraction C eluted with hexane–EtOAc, 7:3 and 6:4, gave C1 (5.55 g) and C2 (22.6 g). Fraction C1 was purified by CC eluted with CHCl₃–EtOAc, 95:5, to obtain **4** (2.26 g). Fraction C2 was submitted to CC eluted with hexane–EtOAc, 4:1 (C2a, 0.81 g), 7:3 (C2b, 2.19 g), and 4:6 (C2c, 19.68 g). Compound **4** (726.3 mg) was obtained from fraction C2a. Fraction C2b was purified by CC on bentonitic clay

to obtain 473.7 mg of **4** eluted with hexane–EtOAc, 7:3, and 449.8 mg of **5** eluted with hexane–EtOAc, 6:4. Fractions C2c1 (2.69 g), C2c2 (8.77 g), and C2c3 (3.25 g) were eluted, respectively, with hexane–EtOAc, 3:2, 2:3, and 7:3, from a bentonitic clay CC of fraction C2c. Fraction C2c1 was purified by bentonitic clay CC eluted with hexane–EtOAc, 3:1 (C2c1a), 7:3 (C2c1b), and 3:7 (C2c1c). Fraction C2c1a gave compound **4** (307 mg). Fraction C2c1b was purified by successive CCs eluted with hexane–EtOAc, 3:1, and CHCl₃–EtOAc, 19:1, to obtain compound **1** (17.9 mg). Compounds **2** (34.9 mg) and **5** (477.7 mg) were obtained after two successive CCs of fraction C2c1c (hexane–EtOAc, 7:3; hexane–EtOAc, 19:1). Silica gel CC of fraction C2c2 (CHCl₃–EtOAc, 19:1) gave **8** (650.4 mg), while CC of fraction C2c3 (CHCl₃–EtOAc, 19:1) gave 225.5 mg of **6** and the mixture of compounds **1**, **6**, and **8**, which were purified by CC eluted with hexane–EtOAc mixtures of increasing polarity; 82.2 mg of **1**, 69.4 mg of **6**, and 55.9 mg of **8** were obtained. 5,6,3'-Trihydroxy-7,4'-dimethoxyflavone (492 mg) was obtained by crystallization (MeOH) from fraction D. Its mother liquors were purified by CC eluted with hexane–EtOAc, 3:2 and 2:3, to obtain fractions D1 and D2, respectively. Fraction D1 (11.3 g) was subjected to CC on bentonitic clay using hexane–EtOAc, 3:2 and 2:3, to obtain D1a and D1b. Silica gel CC (CHCl₃–EtOAc, 9:1) of D1b yielded **3** (34.5 mg).

Tehuainin A (1): colorless crystals (Me₂CO–hexane); mp 240–242 °C; $[\alpha]_D^{25}$ –56.4 (*c* 0.11, Me₂CO); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 207 (3.91), 307 (2.88) nm; IR (KBr) ν_{max} 1772, 1747, 1504, 895 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) see Table 1; FABMS *m/z* 357 [M + H]⁺; HRFABMS *m/z* 357.1330 (calcd for C₂₀H₂₁O₆, 357.1338).

X-ray Single-Crystal Structure Determination of **1** (ref 18).

Crystal data were collected from a colorless block (0.314 × 0.184 × 0.082 mm) at 298(2) K: C₂₀H₂₁O₆, MW = 356.36, monoclinic, space group P2₁, unit cell dimensions *a* = 7.344(2) Å, *b* = 12.490(3) Å, *c* = 8.907(2) Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 90.641(5)^\circ$; *V* = 817.0(4) Å³, *Z* = 2, *D_c* = 1.449 Mg/m³, *F*(000) = 376. A total of 2036 reflections were collected in the range 2.29° < θ < 27.89°, with 2036 independent reflections [*R*(int) = 0.0637]; completeness to θ_{max} was 99.5%. The structure was solved by direct methods and refined by full-matrix least-squares on *F*², with anisotropic temperature factors for non-hydrogen atoms converging at final *R* indices [*I* > 2σ(*I*)], *R*₁ = 0.0513, *wR*₂ = 0.1114; *R* indices (all data), *R*₁ = 0.0700, *wR*₂ = 0.1190.

Tehuainin B (2): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ –40.8 (*c* 0.24, Me₂CO); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 212 (4.10) nm; IR (film) ν_{max} 1750, 1505, 875 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) see Table 1; EIMS *m/z* 356 [M]⁺ (6); HRFABMS *m/z* 357.1335 (calcd for C₂₀H₂₁O₆, 357.1338).

Tehuainin C (3): amorphous powder; $[\alpha]_D^{25}$ –50.0 (*c* 0.21, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 212 (3.36), 265 (2.53) nm; IR (film) ν_{max} 3497, 1754, 1505, 875 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) see Table 1; EIMS *m/z* 372 [M]⁺ (14); HRFABMS *m/z* 373.1281 (calcd for C₂₀H₂₁O₇, 373.1287).

Acetyltehuainin C (3a). A solution of **3** (17.4 mg, 0.05 mmol) in pyridine (0.2 mL) and Ac₂O (0.2 mL) was stirred for 24 h at 50 °C. The reaction mixture was worked up as usual to obtain a residue, which was purified by CC (hexane–EtOAc, 3:2) to give 4.5 mg (23%) of **3a** as an amorphous solid: ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) see Table 1; HRFABMS *m/z* 415.1394 (calcd for C₂₂H₂₃O₈, 415.1393).

Tehuainin D (4): colorless crystals (Me₂CO–hexane); mp 224–226 °C; $[\alpha]_D^{25}$ –174 (*c* 0.15, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 209 (3.93), 266 (3.90), 273 (3.89) nm; IR (KBr) ν_{max} 3432, 3148, 1757, 1718, 1505, 872 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) see Tables 2 and 3; EIMS *m/z* 356 [M]⁺ (16); HRFABMS *m/z* 357.1335 (calcd for C₂₀H₂₁O₆, 357.1338).

Tehuainin E (5): colorless crystals (EtOAc–hexane); mp 247–249 °C; $[\alpha]_D^{25}$ –30 (*c* 0.13, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 210 (3.97) nm; IR (KBr) ν_{max} 3428, 3150, 1757, 1718, 1504, 875 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃+ DMSO-*d*₆) see Tables 2 and 3; EIMS *m/z* 372 [M]⁺ (5); HRFABMS *m/z* 373.1282 (calcd for C₂₀H₂₁O₇, 373.1287).

X-ray Single-Crystal Structure Determination of **5** (ref 18).

Crystal data were collected from a colorless prism (0.314 × 0.228 × 0.218 mm) at 298(2) K: C₂₀H₂₁O₇, MW = 372.36, orthorhombic, space group P2₁2₁2₁, unit cell dimensions *a* = 7.163(1) Å, *b* =

15.233(2) Å, *c* = 15.892(3) Å, *V* = 1734.1(5) Å³, *Z* = 4, *D_c* = 1.426 Mg/m³, *F*(000) = 784. A total of 11 482 reflections were collected in the range 1.85° < θ < 27.89°, with 2371 independent reflections [*R*(int) = 0.0548]; completeness to θ_{max} was 99.8%. The structure was solved by direct methods and refined by full-matrix least-squares on *F*², with anisotropic temperature factors for non-hydrogen atoms converging at final *R* indices [*I* > 2σ(*I*)], *R*₁ = 0.0545, *wR*₂ = 0.1110; *R* indices (all data), *R*₁ = 0.0768, *wR*₂ = 0.1205.

Tehuainin F (6): colorless crystals (MeOH–H₂O); mp 206–208 °C; $[\alpha]_D^{25}$ –93.9 (*c* 0.23, Me₂CO); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 210 (4.02) nm; IR (KBr) ν_{max} 3519, 1767, 1731, 1678, 1512, 871 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) see Tables 2 and 3; EIMS *m/z* 372 [M]⁺ (18); HRFABMS *m/z* 373.1288 (calcd for C₂₀H₂₁O₇, 373.1287).

16-Bromotehuainin F (6a). A 0.2 mL (0.16 mmol) amount of a solution of bromine (0.2 mL) in CH₂Cl₂ (5.0 mL) was dropwise added to a stirred solution of **6** (35.4 mg, 0.095 mmol) in CH₂Cl₂ (10 mL) at 0 °C, under N₂. The reaction mixture was kept at 0 °C for 1 h, then at room temperature for 1 h. The reaction was washed with saturated NaHCO₃ (3 × 5 mL), dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure to yield an oil, which was purified by silica gel CC (CHCl₃/AcOEt, 9:1) to give 8.5 mg (19.8%) of **6a** as colorless crystals (EtOAc/hexane): mp 230–232 °C; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.48 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-15), 6.50 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-14), 6.41 (1H, m, H-3), 5.65 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, H-19_{pro-R}), 5.16 (1H, dd, *J* = 10.5, 7.5 Hz, H-12), 4.68 (1H, m, H-7), 4.13 (1H, br s), 3.93 (1H, dd, *J* = 7.5, 2.5 Hz, H-19_{pro-S}), 3.52 (1H, br s, H-1), 3.10 (1H, d, *J* = 3.0 Hz, H-8), 2.95 (1H, ddd, *J* = 21.0, 3.0, 1.5 Hz, H-2a), 2.74 (1H, ddd, *J* = 21.0, 4.0, 2.5 Hz, H-2b), 2.42 (1H, dd, *J* = 14.0, 2.5 Hz, H-6 α), 2.08 (1H, dd, *J* = 13.5, 7.5 Hz, H-11 β), 2.00 (1H, ddd, *J* = 14.0, 3.5, 2.0 Hz, H-6 β), 1.43 (1H, dd, *J* = 13.5, 10.5 Hz, H-11 α), 1.42 (3H, s, H-20); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 174.1 (C, C-17), 168.7 (C, C-18), 145.3 (CH, C-15), 134.2 (C, C-4), 127.7 (CH, C-3), 122.5 (C, C-13), 121.6 (C, C-16), 111.0 (CH, C-14), 73.3 (CH₂, C-19), 71.3 (CH, C-12), 66.3 (CH, C-7), 63.9 (C, C-10), 57.6 (CH, C-14), 48.4 (CH, C-8), 43.1 (C, C-5), 39.8 (C, C-9), 37.3 (CH₂, C-11), 3.1 (3H, C-2), 27.5 (CH₂, C-2), 23.7 (CH₃, C-20); HRFABMS *m/z* 451.0398 (calcd for C₂₀H₂₀O₇⁷⁹Br, 451.0392).

X-ray Single-Crystal Structure Determination of **6a** (ref 18).

Crystal data were collected from a colorless prism (0.458 × 0.092 × 0.062 mm) at 298(2) K: C₂₀H₁₉BrO₇, MW = 451.26, orthorhombic, space group P2₁2₁2₁, unit cell dimensions *a* = 7.503(1) Å, *b* = 8.168(2) Å, *c* = 31.10(1) Å, *V* = 1906.2(6) Å³, *Z* = 4, *D_c* = 1.572 Mg/m³, *F*(000) = 920. A total of 13 237 reflections were collected in the range 2.58° < θ < 25.34°, with 3473 independent reflections [*R*(int) = 0.0735]; completeness to θ_{max} was 99.8%. The structure was solved by direct methods and refined by full-matrix least-squares on *F*², with anisotropic temperature factors for non-hydrogen atoms converging at final *R* indices [*I* > 2σ(*I*)], *R*₁ = 0.0579, *wR*₂ = 0.1381; *R* indices (all data), *R*₁ = 0.1120, *wR*₂ = 0.1636.

Tehuainin G (7): colorless crystals (EtOAc–hexane); mp 180–182 °C; $[\alpha]_D^{25}$ –76 (*c* 0.18, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 210 (4.25) nm; IR (KBr) ν_{max} 3409, 1759, 1718, 1505, 873 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) see Tables 2 and 3; EIMS *m/z* 372 [M]⁺ (0.2); HRFABMS *m/z* 373.1285 (calcd for C₂₀H₂₁O₇, 373.1287).

Tehuainin H (8): colorless crystals (EtOAc–hexane); mp 243–245 °C; $[\alpha]_D^{25}$ –58.5 (*c* 0.13, Me₂CO); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 210 (4.05) nm; IR (KBr) ν_{max} 3397, 1772, 1708, 1501, 874 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR (CDCl₃) see Tables 2 and 3; FABMS *m/z* 357 [M + H]⁺; HRFABMS *m/z* 357.1347 (calcd for C₂₀H₂₁O₆, 357.1338).

Cytotoxicity Assay. Cytotoxic activity was evaluated by the sulforhodamine B method (SRB), following protocols established by the NCI.¹⁵ All the isolates were screened *in vitro* against six human cancer cell lines: HCT-15 (colorectal adenocarcinoma), K-562 (chronic myelogenous leukemia), MCF-7 (mammary adenocarcinoma), PC-3 (prostatic adenocarcinoma), U-251 (glioblastoma), and SKLU-1 (lung adenocarcinoma) cell lines, supplied by the National Cancer Institute (NCI, USA). Cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 10 000 units/mL penicillin G sodium, 10 000 µg mL⁻¹ streptomycin sulfate, 25 µg mL⁻¹ amphotericin B (Gibco), and 1%

nonessential amino acids (Gibco). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Viability of the cells used in the experiments exceeded 95%, as determined by the trypan blue assay. The cells were removed from the tissue culture flasks by treatment with trypsin and diluted with fresh media. Cell suspensions (100 µL, containing 5000 or 7500 cells per well) were placed into 96-well microtiter plates (Costar) and incubated at 37 °C for 24 h in a 5% CO₂ atm. A 100 µL aliquot of the test compounds at concentrations ranging from 1 × 10⁻³ to 50 µM was added to each well. Camptothecin was used as reference. The cultures were exposed to the drug for 48 h. After the incubation period, cells were fixed by addition of 50 µL of cold 50% aqueous trichloroacetic acid. The plates were incubated at 4 °C for 1 h, washed with tap H₂O, and air-dried. The cells were stained with 0.4% SRB, washed with 1% aqueous acetic acid, and air-dried. Bound dye was solubilized with 10 mM unbuffered Tris base (pH 10.5, 100 µL). The plates were placed on a shaker for 5 min, and the absorption was determined at 515 nm using an ELISA plate reader (Bio-Tex Instruments).

Anti-inflammatory Activity. Anti-inflammatory activity was evaluated in the 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)-induced ear edema model as previously described.¹⁶ Groups of five male CD-1 mice weighing 25–30 g (in accord with the Mexican official norm MON-062-Z00-1999) were anaesthetized with sodium pentobarbital. TPA (2.5 µg) dissolved in EtOH (10 µL) was topically applied to both sides of the right ear of the mice (5 µL each side). The left ear received only EtOH (10 µL). After 10 min, doses of 0.1 to 1.0 µM of the test compounds or indomethacin (reference compound) dissolved in 20 µL of acetone were applied to the right ear (10 µL each side). Control animals received only vehicle (20 µL). Four hours later the animals were sacrificed by cervical dislocation, and a plug (7 mm diameter) was removed from each ear. The swelling was assessed as the difference in weight between the left and the right ear. The percent of inhibition was calculated by the following equation: % = [(A - B) / A]100; A = edema induced by TPA; B = edema induced by TPA plus sample. Data were analyzed by the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test. The IC₅₀ values were estimated from the linear regression equation.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

1D and 2D NMR spectra of compounds 1–8, 3a, 6a, and 11, together with ¹H and ¹³C NMR data of compound 9, are available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +52-55-5622-4412. Fax: +52-55-5622-2217. E-mail: ahortega@unam.mx.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. A. Toscano for the X-ray crystallographic analyses. The authors are grateful to T. Ramírez-Apan and A. Nieto-Camacho for the biological determinations. The authors also acknowledge H. Rios, R. Gaviño, I. Chávez, B. Quiroz, A. Peña, E. Huerta, R. Patiño, E. García, C. Márquez, L. Velasco, and J. Pérez for the determination of optical rotations and NMR, UV, IR, and MS spectra. E.B. thanks CONACyT for a graduate student scholarship.

■ REFERENCES

- (1) (a) Domínguez, V. G.; Berlin, B.; Castro, R. A. E.; Estrada, L. E. I. *J. Anales del Instituto de Biología*; Universidad Nacional Autónoma de México, 2002; Serie Botánica, Vol. 73, pp 39–80. (b) Kamatou, G. P.; Makunga, N. P.; Ramogola, W. P. N.; Viljoen, A. M. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *119*, 664–672.
- (2) (a) Aguilar, A.; Camacho, J. R.; Chino, S.; Jácquez, P.; López, M. E. *Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*; IMSS: México, 1994; pp 107–110. (b) *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*; Argueta, V. A., Ed.; Instituto Nacional Indigenista: México, 1994; Vol. I, p 398.
- (3) Topçu, G.; Türkmen, Z.; Ulubelen, A.; Schilling, J. K.; Kingston, D. G. I. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 118–121.
- (4) Gödkil, G.; Topçu, G.; Sönmez, U.; Ulubelen, A. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 799–800.
- (5) Moghaddam, F. M.; Farimani, M. M.; Seirafi, M.; Taheri, S.; Khavasi, H. R.; Sendker, J.; Proksch, P.; Wray, V.; Edrada, R. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1601–1605.
- (6) (a) Rodríguez-Hahn, L.; Cárdenas, J. In *Current Topics in Phytochemistry*; Asakawa, Y.; Gottlieb, O. R.; Hostettmann, K.; Towers, G. H. N.; Wagner, H.; Waterman, P. G., Eds.; Research Trends: Trivandrum, 1999; Vol. 2, pp 91–101. (b) Ortega, A.; Cárdenas, J.; Toscano, A.; Maldonado, E.; Aumelas, A.; Van Calsteren, M. R.; Jankowski, C. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3357–3360. (c) Wu, S. J.; Chan, H. H.; Hwang, T. L.; Qian, K.; Morris-Natschke, S.; Lee, K. H.; Wu, T. S. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4287–4290. (d) Aoyagi, Y.; Yamazaki, A.; Kato, R.; Tobe, F.; Fukaya, H.; Nishikawa, T.; Nakahashi, A.; Miura, N.; Monde, K.; Takeya, K. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1851–1853.
- (7) (a) Xu, G.; Yang, J.; Wang, Y. Y.; Peng, L. Y.; Yang, X. W.; Pan, Z. H.; Liu, E. D.; Li, Y.; Zhao, Q. S. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12157–12161. (b) Aoyagi, Y.; Yamazaki, A.; Nakatsugawa, C.; Fukaya, H.; Takeya, K.; Kawauchi, S.; Izumi, H. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4429–4432.
- (8) (a) Calzada, F.; Yepez-Mulia, L.; Tapia-Contreras, A.; Bautista, E.; Maldonado, E.; Ortega, A. *Phytother. Res.* **2010**, *24*, 662–665. (b) Sanchez, A. M.; Jimenez-Ortiz, V.; Sartor, T.; Tonn, C. E.; Garcia, E. E.; Nieto, M.; Burgos, M. H.; Sosa, M. A. *Acta Trop.* **2006**, *98*, 118–124.
- (9) Bisio, A.; Damonte, G.; Fraternali, D.; Giacomelli, E.; Salis, A.; Romussi, G.; Cafaggi, S.; Ricci, D.; De Tommasi, N. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 265–275.
- (10) (a) Roth, B. L.; Baner, K.; Westkaemper, R.; Siebert, D.; Rice, K. C.; Steinberg, S.; Ernsberger, P.; Rothman, R. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 11934–11939. (b) Prisinzano, T. E.; Rothman, R. B. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1732–1743.
- (11) Ortega, A.; Blount, J. F.; Manchand, P. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1982**, 2505–2508.
- (12) Despite some differences in the assignment of the NMR signals of compound 9, it was identified as 1,10-dehydrosalviarin, a neoclerodane diterpene previously isolated from *Salvia lineata*.¹³ A complete assignment of the ¹H and ¹³C NMR signals of this compound is given as Supporting Information.
- (13) Esquivel, B.; Cárdenas, J.; Ramamoorthy, T. P.; Rodríguez-Hann, L. *Phytochemistry* **1986**, *25*, 2381–2384.
- (14) Nagao, T.; Abe, F.; Kinjo, J.; Okabe, H. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 875–879.
- (15) (a) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107–1112. (b) Reyes-Gutiérrez, P. E.; Camacho, J. R.; Ramírez-Apan, Ma. T.; Osornio, Y. M.; Martínez, R. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4374–4382.
- (16) (a) Merlos, M.; Gómez, L. A.; Giral, M.; Vericat, M. L.; García-Rafanell, J.; Forn, J. *Br. J. Pharmacol.* **1991**, *104*, 990–994. (b) Arciniegas, A.; Pérez-Castorena, A. L.; Nieto-Camacho, A.; Villaseñor, J. L.; Romo de Vivar, A. *J. Mex. Chem. Soc.* **2009**, *53*, 229–232.
- (17) Cabrera, A.; Peón, J.; Velasco, L.; Miranda, R.; Salmón, A.; Salmón, M. *J. Mol. Catal. A* **1995**, *104*, L5–L7.
- (18) Crystallographic data for the structures of compounds 1, 5, and 6a reported in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre, under reference numbers CCDC 878299, 878300, and 878301, respectively. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to the Director, CCDC, 12

Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK (fax: +44-(0)1223-336033 or
e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk).